



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MOEMA CRISTINA COSTA DE LIMA

**USO DO DNA *BARCODE* NA IDENTIFICAÇÃO DE OVOS DE  
PEIXES NOS TRIBUTÁRIOS DA UHE CAPIVARA, BACIA DO  
RIO PARANAPANEMA**

---

Londrina  
2018



**Universidade Estadual de Londrina**

**Instituto Agronômico do Paraná**

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

---

MOEMA CRISTINA COSTA DE LIMA

**USO DO DNA *BARCODE* NA IDENTIFICAÇÃO DE OVOS DE  
PEIXES NOS TRIBUTÁRIOS DA UHE CAPIVARA, BACIA DO  
RIO PARANAPANEMA**

MOEMA CRISTINA COSTA DE LIMA

**USO DO DNA *BARCODE* NA IDENTIFICAÇÃO DE OVOS DE  
PEIXES NOS TRIBUTÁRIOS DA UHE CAPIVARA, BACIA DO  
RIO PARANAPANEMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Fernanda S. de Almeida

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Lima, Moema Cristina Costa de.

Uso do DNA barcode na identificação de ovos de peixes nos tributários da UHE Capivara, bacia do rio Paranapanema / Moema Cristina Costa de Lima. - Londrina, 2018.  
64 f. : il.

Orientador: Fernanda Simões de Almeida.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Alto rio Paraná - Tese. 2. Reservatórios - Tese. 3. Conservação - Tese. 4. Neotropical - Tese. I. Almeida, Fernanda Simões de . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

MOEMA CRISTINA COSTA DE LIMA

**USO DO DNA *BARCODE* NA IDENTIFICAÇÃO DE OVOS DE PEIXES  
NOS TRIBUTÁRIOS DA UHE CAPIVARA, BACIA DO RIO  
PARANAPANEMA**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Fernanda S. de Almeida  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Ana Cláudia Swarça  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Ana Lúcia Dias  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2018

## **DEDICO**

**Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, a minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. E também a todos os seres vivos que deram à vida em prol da ciência.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar em todos os momentos da minha vida, por renovar a cada momento a minha força e disposição e pelo discernimento concedido ao longo dessa jornada.

Obrigada a Universidade Estadual de Londrina e ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, bem como os coordenadores pela possibilidade de realizar um curso de qualidade em um ambiente tão acolhedor.

A professora Dra. Ana Cláudia Swarça e a querida professora Dra. Ana Lúcia Dias pela solicitude e prontidão em aceitar o convite para avaliar o presente trabalho.

Ao professor Dr. Rogério Fernandes de Souza, pelas ótimas sugestões durante a qualificação para a melhora deste trabalho.

Gratidão à minha querida orientadora Dra. Fernanda Simões de Almeida, por me aceitar como aluna e por me dar a oportunidade de realizar este trabalho. Um exemplo a seguir de mulher, mãe, professora e pesquisadora. Obrigada pelo carinho, conhecimento, por me acalmar em horas de desespero e por aceitar continuar a ser minha orientadora.

Agradeço a professora Dra. Silvia Helena Sofia, por ser um exemplo de pessoa e professora e por fazer o laboratório LAGEA uma família, junto com a professora Fernanda.

Obrigada aos colegas de Laboratório, Carol, Raul, Wilson, Karen pelos momentos de descontração e em especial a Camila, que sempre me socorre quando mais preciso.

Obrigada as novas amigas que fiz durante o curso, Carla Suzuki, Cátia Lie, Renan Appel, Brenda, Felipe Scardovelli, João Antônio, Fernanda Fazon e Ana Paula Ricieto, com vocês vivi momentos de desespero e com certeza de muita alegria.

Aos meus queridos professores da graduação Dr. Bruno Ambrósio Galindo e Dr. Dhiego Gomes Ferreira por terem sido de extrema importância na minha formação tanto na ciência como pessoa. Agradeço pelos momentos de descontração como também de puxões de orelha e principalmente pelos de motivação.

Agradeço aos meus pais por trabalharem duro pela minha educação e por acreditarem e mim quando eu mesma não acreditei. Agradeço as minhas irmãs Ana e Michele que apesar da distância sempre estiveram presentes e em especial a minha irmã Same que além do companheirismo e amizade foi de grande contribuição para este trabalho, obrigada pelo conhecimento e ensinamentos, sem você seria muito mais difícil.

Agradeço aos meus amigos Mariana Terra, Jhonata Fragozo, Ludierri, Ana Balconi, Tiago Alvim, Lennara Alvez, Jéssica Meschine, Jéssica Bernardes, Renata Alfredo, Paulo Rodrigues, Renan Pimnal, Elaine Soares, Jéssica Porfírio, Jociely schmidt, Daniel, Carlos Vieira e Ítalo Stresser por fazerem parte da minha história e por continuarem a fazer parte da minha vida.

Um agradecimento especial aos meus amigos de Assis, Loraine, Rodrigo, Luan, Abel, Thiago, Larissa e Aline que apesar da distância sempre se mantiveram presente, cultivando nossa amizade.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcuta

1 LIMA, M. C. C. **Uso do DNA *barcode* na identificação de ovos de peixes nos tributários**  
2 **da UHE Capivara, bacia do rio Paranapanema.** 2018. 64 f. Dissertação (Mestrado em  
3 Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## 6 RESUMO

9 A construção de barramentos e a estocagem de água são os principais fatores que promovem a  
10 perda da biodiversidade de peixes em ecossistemas aquáticos continentais. Os barramentos  
11 influenciam a reprodução das espécies de peixes ali presentes, consequentemente interferindo  
12 na composição da ictiofauna. Portanto, identificar quais espécies completam seu processo de  
13 recrutamento em ambientes alterados é imprescindível para traçar medidas de conservação  
14 eficazes. A análise da composição e abundância de ovos e larvas de peixes traz informações  
15 sobre o sucesso de permanência das espécies por meio da reprodução em razão dos distúrbios  
16 causados por barramentos. Contudo, a classificação de diferentes fases de desenvolvimento é  
17 complexa, uma vez que muitas das características que distinguem as espécies ainda não estão  
18 desenvolvidas nas fases iniciais dos organismos. Desta forma, a ferramenta DNA *barcode*  
19 vem sendo utilizada para identificar e classificar espécies mesmo nas fases iniciais do  
20 desenvolvimento. O rio Paranapanema possui ao longo de sua calha principal 11 Usinas  
21 hidrelétricas, a maior é a UHE Capivara, que possui como maiores tributários os rios Tibagi e  
22 Cinzas. Estudos de identificação de ictioplâncton no rio Paranapanema apontam uma grande  
23 diversidade para esses tributários. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo  
24 identificar, por meio da utilização da técnica de DNA *barcode*, ovos capturados nos  
25 tributários, rio das Cinzas e Tibagi. Das 928 sequências analisadas, 99,78% foram  
26 indentificadas a nível específico quando confrontadas com o banco de dados Boldsystems®.  
27 Resultando em 25 espécies, 11 famílias e 2 ordens. Das 25 espécies encontradas, mais da  
28 metade (60%) possuem hábito de deslocamento reprodutivo, indicando que os afluentes desse  
29 reservatório estão sendo utilizados como rota migratória por estas espécies. Além disso, foram  
30 encontrados ovos de espécies raras para o médio Paranapanema tais como, *Pseudoplatystoma*  
31 *corruscans* e *Piaractus mesopotamicus* e ovos da espécie ameaçada de extinção  
32 *Pseudopimelodus mangurus*, indicando estes tributários como área de desova para estas  
33 espécies. Os resultados deste estudo demonstraram, a importância da identificação de ovos de  
34 peixes em ambientes influenciados por reservatórios para reconhecer as áreas de reprodução  
35 de espécies nativas e ameaçadas, bem como a importância dos rios Tibagi e Cinzas para a  
36 manutenção de espécies nativas do rio Paranapanema

37 **Palavras-chave:** Alto rio Paraná. Reservatórios. Conservação. Água doce. Neotropical.  
38

39 LIMA, M. C. C. **Use of DNA *barcode* in the identification of fish eggs in the tributaries of**  
40 **the Capivara HPP, Paranapanema River basin.** 2018. 64 pp. Dissertation (Master in  
41 Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.  
42

43  
44 **ABSTRACT**  
45

46  
47 The construction of dams and the water storage are the main factors that promote the loss of  
48 fish biodiversity in continental aquatic ecosystems. The dams influence a reproduction of the  
49 fish species, consequently interfering in the composition of the local ichthyofauna. However,  
50 identifying which species complete recruitment in altered environments is fundamental to  
51 devise effective conservation measures. The analysis of the composition and abundance of  
52 eggs and fish larvae presents information on the success of the species' permanence through  
53 reproduction due to the disturbances caused by dams. However, the classification of different  
54 stages of development is complex, since many of the characteristics that distinguish species  
55 have not been developed in the early stages of organisms. In this way, DNA barcode tool has  
56 been used to identify and classify species even in the early stages of development. The  
57 Paranapanema River has 11 hydroelectric plants along its main channel, the largest is the  
58 Capivara HPP, which has the Tibagi and Cinzas Rivers as the major tributaries. Studies of the  
59 identification of ichthyoplankton in the Paranapanema River point to a great diversity for  
60 these tributaries. In this context, the present study aimed to identify, using DNA *barcode*  
61 technique, eggs captured in tributaries, Rivers Cinzas and Tibagi. Of the 928 sequences  
62 analyzed, 99.78% were identified at a specific level when confronted with the Boldsystems®  
63 database. Resulting in 25 species, 11 families and 2 orders. Of the 25 species found, more  
64 than half (60%) have habit of reproductive displacement, indicating that the tributaries of this  
65 reservoir are being used as a migratory route by these species. In addition, eggs of rare species  
66 for the medium Paranapanema were found, such as *Pseudoplatystoma corruscans* and  
67 *Piaractus mesopotamicus* and eggs of the endangered species *Pseudopimelodus mangurus*,  
68 indicating these tributaries as a spawning area for these species. The results of this study  
69 demonstrated the importance of the identification of fish eggs in environments influenced by  
70 reservoirs to recognize the breeding areas of native and endangered species, as well as the  
71 importance of the Tibagi and Cinzas rivers for the maintenance of native species of the  
72 Paranapanema River  
73

74 **Key words:** Upper Paraná River; Reservoirs; Conservation, Freshwater; Neotropical  
75

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa da bacia hidrográfica do rio Paranapanema com os trechos de amostragem, reservatório de Capivara (CAP), baixo rio Tibagi (BT), rio Congonhas (CO), baixo rio das Cinzas (BC) e médio rio das Cinzas (MC).....40
- Figura 2** - Morfotipos de ovos e definidos à priori. A: ovo com espaço perivitelino reduzido (ID: 14J), B: espaço perivitelino desenvolvido (ID: 1405Ac), C: ovo com matéria orgânica colada (ID: 1411Ac) e D: ovo eclodido (ID: 1427Ac).....41
- Figura 3** - Dendrograma representando as distâncias genéticas das espécies encontradas. A distância genética Kimura-2-Parâmetros relacionada pelo método de Neighbor-Joining com 1000 pseudoréplicas através 5 do software MEGA v6.0. Valores de sustentabilidade dos ramos são apresentados ao lado dos nós em cada bifurcação, valores inferiores a 70% foram ocultados. Os nomes dos grupos em itálico indicam a correspondência ao menor nível taxonômico possível, abundância absoluta indicada entre parênteses. (\*) Espécies para as quais as sequências não estão depositadas no BOLD. ....47
- Figura 4** - Espécies encontradas para cada um dos tributários: rio das Cinzas e rio Tibagi .....50

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Espécies identificadas a partir de ovos provenientes dos principais tributários do reservatório de Capivara. N: Número de capturas; BOLD (%): Média das similaridades para o táxon mais próximo encontradas através do Sistema de Identificação Boldsystems®; D (%): Média de distância genética dentro dos grupos; VP (%): Vizinho mais próximo; DVP (%): Distância para o táxon mais próximo; EP (%): Erro padrão. Índices de similaridade considerados neste estudo: 99 – 100% correspondência específica; 94 – 99% congênica; < 94 % correspondência ao nível de família. Táxons que não puderam ser identificadas com base apenas no índice de similaridade BOLD (\*\*) correspondência <94 % níveis baseados em Frantine-silva et al. 2015.....44
- Tabela 2** - Resumo da distribuição de frequência relativa das distâncias genéticas K2P intraespecíficas e interespecíficas. Conjunto de dados utilizados englobam apenas sequências de espécimes identificados. Não foram considerados nos cálculos de comparação os grupos com apenas um representante para o grupo. Valores (%).....46
- Tabela 3** - Tabela de distribuição de espécies nos tributários do reservatório de Capivara (dezembro de 2012 a março de 2015). (%) Frequência relativa é demonstrada para cada espécie (N): Frequência absoluta, por ponto de coleta. BC: baixo Cinzas; MC: médio Cinzas; CO: rio Congonhas e BT: baixo Tibagi. ‡ Espécie ameaçada de extinção (Abilhoa & Duboc 2004). †Espécie não nativa para o alto rio Paraná (Júlio Júnior et al. 2009).....49

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
1.1	REGIÃO NEOTROPICAL E ICTIOFAUNA .....	15
1.2	IMPACTOS DOS BARRAMENTOS HIDRELÉTRICOS .....	16
1.3	ALTO RIO PARANÁ, RIO PARANAPANEMA E TRIBUTÁRIOS .....	19
1.4	ICTIOPLÂNCTON.....	22
1.5	DNA MITOCONDRIAL E DNA BARCODE .....	24
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	35
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
	<b>Capítulo 1</b> .....	36
	<b>RESUMO</b> .....	36
	<b>Introdução</b> .....	37
	<b>Material e métodos</b> .....	39
	<b>Extração do DNA</b> .....	41
	<b>Amplificação do gene COI</b> .....	41
	<b>Purificação e sequenciamento</b> .....	42
	<b>Análise dos dados</b> .....	42
	<b>Resultados</b> .....	43
	<b>Identificação Molecular e Distância Genética</b> .....	43
	<b>Discussão</b> .....	51
	<b>Resolução do status taxonômico dos ovos de peixes</b> .....	51
	<b>Abundancia e composição taxonômica</b> .....	54
	<b>Referências</b> .....	58

# 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 REGIÃO NEOTROPICAL E ICTIOFAUNA

Os peixes constituem o grupo mais diversificado entre os vertebrados (LOWE-McCONNELL, 1999; REIS; KULLANDER; FERRARI, 2003) Segundo Nelson (2016) das 60.000 espécies de vertebrados do Mundo, mais da metade (32.000) são de peixes. Na revisão taxonômica mais recente realizada por Nelson, 2016 foram reconhecidas 85 ordens e 536 famílias de peixes, sendo que cerca de dois terços de todas as espécies nas maiores famílias são peixes de água doce. Os habitats de água doce compreendem apenas uma pequena proporção das águas superficiais da Terra, mas contêm um número desproporcionalmente elevado de espécies de peixes do mundo (NELSON, 2016). Segundo Lévêque et al. (2008), é estimado 13.000 espécies de peixes de água doce para o planeta.

A região Neotropical abrange uma das maiores concentrações de diversidade biológica da Terra (REIS; KULLANDER; FERRARI, 2003; AGOSTINHO & GOMES 2005; LÉVÊQUE et al., 2008; ALBERT & REIS, 2011). As espécies dessa região apresentam fantástica heterogeneidade de formas e histórias de vida (AGOSTINHO, GOMES, PELICICE, 2007) bem como apresentam altas taxas de endemismos para vertebrados, principalmente representadas por peixes (BALIAN et al., 2008). Muitos fatores podem ter influenciado o delineamento desta região como uma das mais diversas do mundo, como a grande área geográfica disponível e sua correlação positiva com o aumento de diversidade (MACARTHUR E WILSON, 1967) e ampla disponibilidade de energia e clima (WRIGHT, 1983).

Estima-se que cerca de 70% da ictiofauna continental seja exclusivamente restrita à região Neotropical (LÉVÊQUE et al., 2008). Embora muitas de suas espécies ainda não tenham sido descritas, estimativas apontam para a existência de cerca de 6.000 espécies de peixes, distribuídas em 71 famílias diferentes (REIS; KULLANDER; FERRARI, 2003; LÉVÊQUE et al., 2008). Contudo, este número ainda sofrerá acréscimos à medida que novas bacias ainda não inventariadas forem investigadas, uma vez que Schaefer (1998) estimou uma riqueza de 8.000 espécies para esta região. Tais espécies constituem uma ictiofauna bastante diversificada, a qual se distribui ao longo das Américas do Sul e Central, englobando drenagens desde o sul do México até o estuário do rio da Prata, ao norte da Argentina (REIS; KULLANDER; FERRARI, 2003; ALBERT & REIS, 2011). A maior parte da ictiofauna de água doce Neotropical está distribuída em cinco grupos dominantes: Characiformes com cerca de 1.500 espécies descritas, Siluriformes com pelo menos 1.400 espécies conhecidas,

35 Perciformes com cerca de 450 espécies, Cyprinodontiformes com cerca de 400 espécies e  
36 Gymnotiformes com cerca de 180 espécies (LÉVÊQUE et al., 2008). Entre as espécies  
37 válidas, a maior diversidade é representada pela família Characidae, seguida pela família  
38 Loricaridae e Cichlidae, respectivamente (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003).

39 A maior parte da região Neotropical é composta por territórios da América do Sul. Tal  
40 continente possui uma hidrografia extremamente rica, apresentando os sistemas Amazonas-  
41 Orinoco e Paraná-Paraguai com as maiores regiões hidrogeográficas (ALBERT & REIS,  
42 2011). Grande parte de ambas as bacias estão presentes em território brasileiro, fazendo com  
43 que o Brasil seja o país detentor da mais extensa rede hidrográfica do mundo, contribuindo  
44 com uma grande parcela desta biodiversidade, exibindo cerca de 2.500 espécies de peixes  
45 (GRAÇA & PAVANELLI, 2007).

46 Contudo nenhum rio brasileiro teve sua fauna completamente identificada. Os  
47 primeiros inventários no alto rio Paraná, por exemplo, iniciaram-se há menos de 25 anos, e a  
48 maioria dos 130 reservatórios com barragens de altura superior a 10m, existentes na bacia, já  
49 estavam construídos (AGOSTINHO, GOMES, PELICICE, 2007). Apesar de muitas espécies  
50 ainda não estarem descritas, as alterações promovidas em ambientes aquáticos continentais  
51 nas últimas décadas (principalmente com a introdução de espécies exóticas, construção de  
52 barragens e poluição) vêm ameaçando a perpetuação de populações naturais. Para efetivar a  
53 sua conservação, o valor da ictiofauna precisa ser rapidamente melhor apreciado, em termos  
54 econômicos, científicos e ecológicos (AGOSTINHO, GOMES, PELICICE, 2007).

55

## 56 1.2 IMPACTOS DOS BARRAMENTOS HIDRELÉTRICOS

57 Embora sejam muito diversos, os ecossistemas de água doce estão entre os ambientes  
58 naturais mais ameaçados (DUDGEON et al., 2006; STRAYER & DUDGEON, 2010). As  
59 principais ameaças apontadas por diversos autores são: poluição, destruição e degradação do  
60 habitat, sobre-exploração, alteração no fluxo natural da água, construção de barramentos,  
61 controle de cheias, pesca e introdução de espécies exóticas (VRIJENHOEK, 1998;  
62 AGOSTINHO & GOMES 2005; DUDGEON et al., 2006; LÉVÊQUE et al., 2008; GEIST,  
63 2011); Essas ameaças citadas anteriormente variam consideravelmente em número e  
64 importância de acordo com as diferentes regiões do Brasil, a densidade populacional humana,  
65 o uso do solo e as características socioeconômicas predominantes (AGOSTINHO & GOMES  
66 2005; AGOSTINHO et al., 2007).

67 A maioria das Usinas Hidrelétricas localizam-se principalmente nas regiões sul e  
68 sudeste, onde estão localizadas duas grandes bacias: a bacia do Paraná e a bacia do São  
69 Francisco, que possuem boa parte do seu potencial hidrelétrico já utilizado, 72% e 58%  
70 respectivamente (ANEEL, 2008). A bacia do rio Paraná localiza-se na região mais populosa  
71 do país, e é responsável pela produção de 70% da hidroeletricidade no Brasil (AGOSTINHO,  
72 PELICICE, GOMES, 2008).

73 A implantação destas usinas causa alterações de modo profundo e definitivo na  
74 dinâmica da água, passando de um estado lótico para uma condição lântica ou semi-lântica,  
75 determinando consideráveis modificações nas comunidades bióticas localizadas em suas áreas  
76 de influência (AGOSTINHO et al., 1992; AGOSTINHO, GOMES, PELICICE, 2007). Deste  
77 modo, mudanças drásticas ocorrem tanto à montante quanto à jusante do barramento,  
78 influenciadas principalmente pelas perdas de conectividade, diminuição da disponibilidade de  
79 habitats e alterações no regime de descarga dos rios, desencadeando mudanças drásticas sobre  
80 as populações de peixes (AGOSTINHO et al., 2004).

81 No caso particular da ictiofauna, impactos de barramentos podem ser compreendidos  
82 de modo mais amplo quando se considera suas dimensões espaciais e temporais  
83 (AGOSTINHO et al., 1992; NILSSON et al., 2005). Dentre as dimensões espaciais pode-se  
84 destacar: alterações no fluxo e na qualidade da água que é liberada à jusante; alterações nas  
85 características físicas, químicas e biológicas dentro do reservatório; e alterações à montante  
86 como o confinamento seletivo de algumas espécies em trechos da área de distribuição original  
87 e a propagação de outras espécies a partir do ambiente represado (AGOSTINHO et al., 1992).  
88 Considerando a área alagada, ou seja, no corpo do reservatório, algumas espécies são  
89 incapazes de sobreviver, devido, principalmente, à temperatura da água e/ou oxigênio  
90 dissolvido, baixa diversidade de habitats, baixo fluxo de água, locais de desovas  
91 inapropriados, falta de presas suficientes para um estágio particular do ciclo de vida, ou falta  
92 de refúgio para as presas (AGOSTINHO & GOMES 2005; AGOSTINHO, GOMES,  
93 PELICICE, 2007). Nestas situações é esperada uma redução da riqueza de espécies e da  
94 diversidade de peixes na zona lacustre, principalmente porque algumas espécies, menos  
95 adaptadas a tais ambientes, são localmente eliminadas, enquanto que aquelas mais adaptadas  
96 aos ambientes lacustres se tornam dominantes e numerosas (AGOSTINHO et al., 2008).  
97 Além disto, impactos adicionais também podem ocorrer pela introdução de espécies não  
98 nativas. Estas espécies comumente são adaptadas aos ambientes lacustres e estabelecem  
99 grandes populações, causando pressões adicionais sobre a ictiofauna remanescente (POFF et  
100 al., 1997; AGOSTINHO, GOMES, PELICICE, 2007; PELICICE e AGOSTINHO, 2009).

101 A inundação do reservatório também pode eliminar importantes barreiras geográficas  
102 entre diferentes comunidades ictiofaunísticas, promovendo subseqüentes introduções em  
103 trechos   montante do represamento, como observado para diversas espécies que foram  
104 introduzidas nos trechos altos da bacia do rio Paraná após a inundação do Salto de Sete  
105 Quedas (Quedas de Guaíra) (AGOSTINHO et al., 1992; LANGEANI et al., 2007; JÚLIO Jr  
106 et al., 2009).

107 Grandes impactos sobre as assembleias de peixes ocorrem também devido as  
108 mudanç as no fluxo   jusante, dentre estas, principalmente a perda substancial de áreas  
109 alagadas, ambientes fundamentais para a reprodução de várias espécies, fornecendo alimento,  
110 abrigo e proteção para juvenis; e a origem de condições hidrológicas inviáveis para a  
111 manutenção das fases iniciais de muitas espécies de peixes (PONTON & VAUCHEL, 1998).  
112 Além disto, abaixo dos barramentos também podem ocorrer: aumento da transparência das  
113  guas, contribuindo para o aumento da predação durante o período reprodutivo; o controle da  
114 vazão, fator que pode desencadear desovas fora da época adequada; a saturação gasosa de  
115  reas adjacentes à barragem; a mortandade de peixes em turbinas e vertedouros; o aumento da  
116 predação próximo ao obstáculo; e a morte em massa devido à exposição do leito do rio  
117 durante a formação do lago (AGOSTINHO et al., 1992).

118 Dentre as várias alterações causadas pela implantação de barramentos o próprio  
119 barramento já se destaca como um dos maiores impactos, pois impede os movimentos que  
120 ocorriam naturalmente ao longo do fluxo, incluindo o deslocamento ascendente de peixes  
121 migradores e a dispersão descendente de ovos e juvenis e somando a isto, estas construções  
122 levam perda de hábitats propícios a reprodução e fragmentação populacional (HILSDORF &  
123 PETRERE Jr, 2002). As espécies migradoras geralmente necessitam de trechos livres para  
124 alcanç ar suas áreas de desova rio acima, os quais estão tanto na calha principal quanto em  
125 tributários de uma bacia. Contudo, a presenç a de barramentos acaba interrompendo a  
126 dispersão natural destas espécies, interferindo na reprodução e eliminando importantes rotas  
127 migratórias (HILSDORF & PETRERE Jr, 2002). Conseqüentemente, o obstáculo também se  
128 torna uma grande ameaça ao fluxo g nico e a diversidade genética dentro e entre as  
129 populações naturais (PETRERE Jr, 1996; VRIJENHOEK, 1998; AGOSTINHO & GOMES  
130 2005). Segundo Antonio et al. (2007), se as rotas migratórias de peixes que utilizam a calha  
131 principal forem interrompidas, tributários que apresentam trechos livres de barragens e  
132 condições l ticas podem servir como rotas alternativas, desempenhando importantes funções  
133 na manutenção da biodiversidade regional.

### 135 1.3 ALTO RIO PARANÁ, RIO PARANAPANEMA E TRIBUTÁRIOS

136 O Brasil é privilegiado por uma grande rede de cursos d'água, detendo as  
137 maiores redes hidrográficas do mundo e, conseqüentemente, as maiores da região  
138 Neotropical, sendo a bacia Amazônica a primeira em termos de área de drenagem, seguida  
139 pela bacia do rio Paraná (STEVAUX; SOUZA-FILHO; JABUR, 1997). Esta última, drena  
140 uma área de 4.695 km<sup>2</sup> de extensão (AGOSTINHO et al., 1995), ocupando a maior parte do  
141 centro-sul do continente sul-americano. Além do rio Paraná, este sistema também engloba  
142 outras importantes bacias hidrográficas Neotropicais, tais como o rio Uruguai e o rio  
143 Paraguai, cobrindo territórios do Brasil, Paraguai e Argentina (LOWE-McCONNELL, 1999;  
144 AGOSTINHO, GOMES, PELICICE, 2007). Drenagens desta bacia geralmente seguem os  
145 padrões de rios de planalto, exibindo uma inclinação média de 0,8 m por km, diminuindo na  
146 porção média para 0,3 m por km (AGOSTINHO et al., 2007a). Este fato acabou contribuindo  
147 para que a bacia do rio Paraná fosse transformada na maior fonte de geração de energia  
148 hidroelétrica do Brasil, apresentando uma grande quantidade de barramentos distribuídos ao  
149 longo do canal principal e dos principais afluentes, principalmente nas partes média e alta da  
150 bacia. Considerando o setor energético, o sistema alto rio Paraná abriga a maior parte dos  
151 empreendimentos hidrelétricos que abastecem o Brasil, fornecendo cerca de 70% da energia  
152 elétrica produzida no país (AGOSTINHO et al., 2007a). A maioria dos grandes afluentes  
153 localizados nesta bacia, incluindo os rios Paranaíba, Grande, Tietê e Paranapanema, e o canal  
154 principal do rio Paraná, foram transformados em sistemas de cascatas de reservatórios, com  
155 vários barramentos consecutivos (AGOSTINHO et al., 2008)

156

157 Ao todo, o alto rio Paraná drena aproximadamente 900.000 km<sup>2</sup>, incluindo uma  
158 pequena parte do território paraguaio, na divisa com o Mato Grosso do Sul. No território  
159 brasileiro, esta bacia está presente no estado do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul, na maior  
160 parte do estado de São Paulo, sul do estado de Minas Gerais e sul do estado de Goiás  
161 (AGOSTINHO; JÚLIO Jr, 1999; CASTRO et al., 2003). No Paraná, se estende até montante  
162 da cidade de Guaíra, antiga Sete Quedas, hoje submersa pelo reservatório de Itaipu  
163 (AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007).

164 Esta bacia é constituída por oito sub-bacias: Paranaíba, Grande, Tietê, Peixe, Pardo,  
165 Paranapanema, Iguaçu, Alto Paraguai (ITAIPU – BINACIONAL, 2016), sendo a bacia mais  
166 investigada em se tratando de peixes de água doce brasileiros (AGOSTINHO; GOMES;  
167 PELICICE, 2007). No entanto, mesmo em regiões tão bem estudadas como o sistema do Alto

168 rio Paraná ainda existem lacunas de localidades que carecem de inventários ictiofaunísticos  
169 (GALVES, SHIBATTA, JEREP, 2009). Para esta bacia, foi identificado um total de 310  
170 espécies diferentes, distribuídas em 11 ordens e 38 famílias. A maior riqueza é registrada para  
171 as ordens Siluriformes e Characiformes, correspondentes a cerca de 80% das espécies  
172 encontradas (LANGEANI et al., 2007). Estas espécies correspondem aos grupos dominantes  
173 na maior parte dos ambientes lóticos do alto rio Paraná. Contudo, nos ambientes lênticos,  
174 principalmente nos lagos artificiais formados pelos barramentos, tem sido registrado um  
175 aumento considerável da abundância de populações de espécies exóticas ou alóctones  
176 (LOWE-McCONNELL, 1999; LANGEANI et al., 2007).

177 Os rios Paranapanema, Iguaçu e Tietê destacam-se como afluentes de grande porte do  
178 rio Paraná. O rio Paranapanema faz parte do sistema do Alto rio Paraná, com nascente na  
179 serra de Paranapiacaba (Estado de São Paulo), percorrendo aproximadamente 930 km até  
180 desaguar no rio Paraná. Em boa parte de sua extensão faz a divisa entre os estados do Paraná e  
181 São Paulo e tem importância para aproveitamento hidrelétrico (DUKE-ENERGY, 2003). O  
182 mesmo possui importantes tributários no estado do Paraná, sendo os de maior porte os rios  
183 Itararé, Cinzas, Tibagi e Pirapó, enquanto que em São Paulo há um único grande tributário,  
184 que é o rio Pardo (HOFFMANN; ORSI & SHIBATTA, 2005).

185 Ao longo de sua calha principal, o rio Paranapanema possui, atualmente, 11 Usinas  
186 Hidrelétricas em funcionamento com capacidade para gerar 2.386.756 KW (BIG - ANEEL,  
187 2008) A usina com maior capacidade de geração, UHE Capivara com potência instalada de  
188 619 MW, teve sua construção iniciada em 1971 e iniciou a operação em 1977, com um  
189 reservatório de acumulação de 576 km<sup>2</sup>, onde armazenam-se em torno de 10,5 bilhões de m<sup>3</sup>  
190 de água (DUKE-ENERGY, 2016). Este reservatório possui 100 km de comprimento e  
191 larguras que variam de 800 a 10.000 metros. A profundidade varia de 70m próximo à  
192 barragem até 6m à montante, próximo à barragem da UHE Canoas I (HOFFMANN; ORSI &  
193 SHIBATTA, 2005).

194 O reservatório de Capivara localiza-se entre os reservatórios de Taquaruçu e Canoas I,  
195 respectivamente à sua jusante e montante. Anteriormente à implantação do complexo UHE  
196 Canoas I e II em 1999, havia um grande trecho de rio livre de barramento, com  
197 aproximadamente 200km que preservava características lóticas. Com o término da construção  
198 do complexo Canoas os únicos trechos lóticos da represa de Capivara restringiam-se aos seus  
199 principais tributários: os rios das Cinzas e Tibagi (VIANNA & NOGUEIRA, 2008).

200 O rio Tibagi é um dos principais afluentes do rio Paranapanema, ele apresenta cerca de  
201 550 km de extensão, com uma área de drenagem de aproximadamente 25.239 km<sup>2</sup>. Nasce a

202 25°S e 51°W no município de Palmeira, e deságua em 23°S e 49°W no município de Primeiro  
203 de Maio (MAACK, 2002; SHIBATTA et al., 2002). É um rio que possui a influência de  
204 alguns reservatórios, mas ainda mantém a característica de ser um rio lótico (SHIBATTA et  
205 al., 2002). Apesar da contribuição do rio Tibagi à manutenção da diversidade de peixes da  
206 região média do rio Paranapanema muito de sua ictiofauna ainda não é conhecida (GALVES;  
207 SHIBATTA; JEREP, 2009). Um estudo para inventariar a ictiofauna foi realizado no rio  
208 Tibagi por Shibatta, Gealh & Bennemann, (2007), onde foram encontradas um total de 123  
209 espécies.

210 A bacia do rio das Cinzas possui uma extensão de 240 km e os seus principais  
211 afluentes são: ribeirão Grande, ribeirão Jaboticabal, ribeirão Vermelho e rio Laranjinha,  
212 também denominado “rio do Peixe” sendo o principal afluente da sua margem esquerda  
213 (SEMA, 2010). O rio das Cinzas é o principal curso d’água do Norte Pioneiro do Paraná,  
214 nasce na Serra de Furnas no município de Piraí do Sul a oeste da Escapa Devoniana e deságua  
215 no rio Paranapanema na divisa dos municípios de Santa Mariana e Itambaracá. A importância  
216 da bacia do rio das Cinzas é inferida por diversos autores que o apontam como possível rota  
217 migratória, portanto, fundamental para a manutenção das populações de diversas espécies de  
218 peixes do médio Paranapanema (HOFFMANN, ORSI & SHIBATTA, 2005; PAULA, 2006;  
219 LOPES et al., 2007; VIANNA & NOGUEIRA, 2008; ORSI, 2010).

220 Apesar da bacia do rio das Cinzas ser importante para a região, nunca foi totalmente  
221 inventariada e alguns trabalhos realizados documentam parcialmente sua ictiofauna.  
222 Hoffmann, Orsi e Shibatta (2005) realizaram um levantamento da diversidade de peixes no  
223 reservatório de Capivara, e das 67 espécies capturadas 62 ocorriam na foz do rio das Cinzas.  
224 Galindo (2014) realizou um levantamento ictiofaunístico em um afluente do rio das Cinzas, o  
225 rio Laranjinha onde foram encontradas 103 espécies, distribuídas em sete ordens e 25  
226 famílias. Deste modo, pode-se imaginar que o número de espécies para a bacia do rio das  
227 Cinzas ainda está subestimado. Galves, Shibatta e Jerep (2009) chamam a atenção para a  
228 importância de se conduzirem estudos complementares em áreas que, eventualmente, já  
229 tenham sido inventariadas em algum nível. Segundo Costa et al. (2013) para conhecer a  
230 diversidade de peixes de uma bacia, não se pode limitar apenas à calha principal, deve-se  
231 buscar informações em pequenos tributários pois estes abrigam uma parte importante da  
232 diversidade.

233

234 1.4 ICTIOPLÂNCTON

235 O ictioplâncton representa as fases iniciais do ciclo de vida dos peixes na zona  
236 planctônica, compreendendo os ovos e larvas (SMITH; JOHNSON, 1996). A fase de ovo é  
237 compreendida entre a fecundação e a eclosão (período embrionário) e a fase larval é  
238 compreendida entre a eclosão e a metamorfose (período larval) (RÉ, 1999).

239 Segundo Sars (1865) o início dos estudos de ovos e estados larvares dos peixes situa-  
240 se no final do século XIX, onde foram efetuadas as primeiras investigações sobre a pesca de  
241 *Gadus morhua* e foi verificado que esta espécie possuía ovos planctônicos (apud RÉ, 1999).

242 Esses estudos têm contribuído sobremaneira para o avanço da investigação nos  
243 domínios da Ictiologia. Ré (1984) resume sua importância em:

- 244 ○ Clarificação da posição sistemática e/ou filogenética de certas espécies ou grupos  
245 de espécies.
- 246 ○ Estudos de desenvolvimento, alimentação, crescimento, mortalidade, transporte e  
247 comportamento dos estados larvares dos peixes.
- 248 ○ Conhecimento das épocas de postura a partir do período de captura do  
249 ictioplâncton.
- 250 ○ Delimitação das áreas frequentadas pela população adulta no momento da postura  
251 (área de postura).
- 252 ○ Estimativa da biomassa da população adulta através da avaliação da abundância e  
253 distribuição do ictioplâncton.
- 254 ○ Avaliação das abundâncias relativas das populações de espécies com interesse  
255 econômico.

256 Segundo Nakatani (2001), os estudos sobre a distribuição e abundância do  
257 ictioplâncton são de extrema importância para determinar os períodos e locais de desova e  
258 auxiliar na identificação de áreas para a implementação de medidas de orientação, visando sua  
259 preservação. De acordo com Nakatani et al. (1997) o estudo do ictioplâncton tem se mostrado  
260 eficiente acerca da avaliação do recrutamento das comunidades de peixes contudo, a maioria  
261 das descrições e ilustrações de ovos, larvas e juvenis para espécies de água doce se encontram  
262 dispersas na literatura, bem como existe um limitado número de especialistas disponíveis  
263 (NAKATANI et al., 2001).

264 Os estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes, assim como os adultos,  
265 apresentam diferentes padrões de distribuição, tanto espaciais quanto temporais. A estrutura  
266 da assembleia de larvas de peixes é diretamente influenciada pelo modo, local, período,

267 duração e intensidade reprodutiva dos adultos, que só se reproduzem em condições  
268 adequadas, a fim de garantir um número suficiente de sobreviventes (BIALETZKI et al.,  
269 2005).

270 A maioria dos rios de maior porte no Brasil sofre a influência de empreendimentos  
271 hidrelétricos (AGOSTINHO et al., 2008). O impacto de reservatório pode atuar em diferentes  
272 maneiras sobre a comunidade ictioplânctônica, podendo suprimir áreas de desovas, áreas de  
273 desenvolvimento inicial (lagoas marginais, tributários e remansos), e separar áreas de desova  
274 das áreas de desenvolvimento inicial (AGOSTINHO et al., 2007; ANTÔNIO et al., 2007;  
275 GOGOLA et al., 2010; POMPEU et al., 2011). Porém, na maioria dos casos, não existem  
276 informações sobre a dinâmica dos ovos e larvas de peixes anteriores à construção destas  
277 usinas, dificultando a criação de ações de manejo e conservação nas áreas após a formação do  
278 reservatório (SOUZA, 2013).

279 No rio Paraná estudos sobre distribuição e abundância do ictioplâncton têm-se  
280 concentrado principalmente na porção superior (alto rio Paraná) (BAUMGARTNER et al.  
281 1997; NAKATANI et al., 1997; BIALETZKI et al., 2005). No entanto, estes ainda são  
282 insuficientes, visto a extensão da área e a composição da ictiofauna presente (DUKE  
283 ENERGY, 2008). Baumgartner et al. (1997), ao realizarem um estudo sobre aspectos  
284 ecológicos das larvas de peixes no alto rio Paraná observaram que os maiores números de  
285 captura das larvas foram em ambientes lóticos e com mais frequência na superfície durante o  
286 período noturno e na parte inferior durante o dia. Além disso, a maior densidade destas se  
287 estendeu de novembro a março e coincidiu com o período de reprodução da grande maioria  
288 das espécies na planície de inundação. As maiores densidades foram associadas a  
289 temperaturas mais elevadas, maior tempo durante o dia e aumento fluviométrico.

290 Bialezki et al. (2005) avaliaram a composição taxonômica e a distribuição temporal e  
291 espacial das larvas de peixes no rio Baía do estado do Mato Grosso do Sul e observaram que o  
292 ictioplâncton foi composto principalmente por espécies sedentárias de tamanho pequeno e  
293 médio das ordens Perciformes, Siluriformes, Characiformes e Pleuronectiformes, tais como:  
294 *Plagioscion squamosissimus*, *Hipophthalmus edentatus*, *Hoplias* aff. *malabaricus*,  
295 *Bryconamericus stramineus*, *Serrasalmus* spp. e *Catathyridium jenynsi*. Além disso relataram  
296 padrões distintos de ocorrência temporal e espacial entre as larvas das espécies. Nakatani et  
297 al. (2005) realizaram estudo sobre a distribuição de larvas e juvenis em 31 reservatório  
298 paranaenses, e identificaram a presença de 50 grupos taxonômicos distintos, pertencentes a  
299 cinco ordens, onde a ordem Characiformes apresentou o maior número de táxons. Dentre

300 todos os reservatórios, os pertencentes às bacias do rio Iguaçu e do rio Paranapanema  
301 apresentaram o maior número de grupos taxonômicos.

302 Contudo, poucos estudos que abordam a distribuição de ovos e larvas de peixes foram  
303 realizados no rio Paranapanema. Kipper et al., (2011), ao avaliarem a composição taxonômica  
304 da assembleia de larvas de peixes em diferentes pontos no reservatório de Rosana no rio  
305 Paranapanema, concluíram que os táxons que tiveram maior contribuição na região limnética  
306 foram *Plagioscion squamosissimus* (Perciformes), *Hypophthalmus edentatus*, *Pimelodus*  
307 *maculatus* (Siluriformes), *Astyanax* spp. e *Roeboides descalvadensis* (Characiformes),  
308 enquanto na região litorânea foram encontrados apenas *Bryconamericus stramineus* e  
309 *Apareiodon affinis* (Characiformes). Os autores relatam que essa diferença na composição de  
310 espécies de larvas, supostamente é devido a preferência por habitats ou por questões  
311 evolutivas que envolvem as estratégias reprodutivas das espécies.

312 Vianna e Nogueira (2008) conduziram um trabalho em pontos do rio das Cinzas e na  
313 foz do rio Laranjinha (tributários do rio Paranapanema), realizando coletas de ovos, larvas e  
314 indivíduos juvenis, e registraram 57 espécies de peixes. Concluíram quanto às variações  
315 espacial e temporal de espécies e a grande importância deste afluente como rota alternativa  
316 para sítios de desova e berçários.

317 Devido a dificuldades de identificação de ovos e larvas de peixes baseados em  
318 caracteres morfológicos, os estudos de ictioplâncton de água doce têm se restringindo a  
319 correlacionar a distribuição e abundância de ovos às variáveis ambientais como os níveis de  
320 precipitação, concentração de oxigênio dissolvido, turbidez da água, temperatura entre outros  
321 (MATARESE et al., 2003; BIALETZKI et al., 2005; COSTA & SOUZA-CONCEIÇÃO,  
322 2009). A fim de identificar espécies e esclarecer incertezas levantadas durante a identificação  
323 morfológica de ictioplâncton, alguns trabalhos têm utilizado como ferramenta o *DNA*  
324 *barcode*. Esta técnica vem sendo utilizada com sucesso tanto para identificação de espécies de  
325 água doce quanto marinhas (HUBERT et al., 2008; NEIRA; KEANE; 2008; PEREIRA et al.,  
326 2011).

327

### 328 1.5 DNA MITOCONDRIAL E DNA BARCODE

329 Os dados morfológicos foram, historicamente, os primeiros a serem utilizados na  
330 identificação de espécies simplesmente pelo fato de serem os primeiros disponíveis aos  
331 pesquisadores, que iniciaram a sistematização do conhecimento sobre os seres vivos.  
332 (PEREIRA, 2011). A forma tradicional de identificação de espécies enfrenta algumas

333 limitações, devido ao uso de caracteres, utilizados no reconhecimento das espécies, poderem  
334 levar ao erro, devido a existência de espécies crípticas. Deste modo, novas metodologias são  
335 necessárias para auxiliar os métodos tradicionais no conhecimento da biodiversidade  
336 (HEBERT et al., 2003). Para isso, a biologia molecular tem se mostrado uma importante  
337 ferramenta (PEREIRA, 2011).

338 O DNA mitocondrial (mtDNA), além de ser abundante, pois cada célula possui  
339 inúmeras mitocôndrias, é um material de fácil purificação em extrações (ALLENORF;  
340 LUIKART, 2007). Nos organismos que possuem mitocôndrias, tal molécula é circular e de  
341 fita dupla. Entre os vertebrados, os peixes apresentam um DNA mitocondrial que varia de  
342 15.2 a 19.8 kb (kilobases) (BILLINGTON; HEBERT, 1991). A análise de DNA mitocondrial  
343 em animais tornou-se muito popular em estudos genéticos devido à ausência de recombinação  
344 dessa molécula, altas taxas de mutação e disponibilidade de *primers* universais (FREELAND,  
345 2005).

346 Uma característica importante desse genoma é a herança materna, não seguindo o  
347 padrão de herança mendeliana. Desse modo, tornam um genótipo ou haplótipo mitocondrial  
348 muito útil no delineamento da genealogia materna ou mesmo filogenia materna (ARIAS &  
349 INFANTE-MALACHIAS, 2012). O genoma mitocondrial apresenta uma alta taxa de  
350 evolução quando comparado a um gene de cópia única nuclear, pois possui mutações, cerca  
351 de 5 a 10 vezes maior do que os genes codificadores de proteínas do DNA nuclear e as  
352 consequências disto são regiões bastante variáveis, que podem ser utilizadas para diferenciar  
353 indivíduos de espécies diferentes (BROWN, 1980; BROWN et al., 1982). A taxa mutacional  
354 apresentada pelo DNAm<sub>t</sub> permite ser utilizada para inferir relações filogenéticas entre  
355 populações ou espécies, com tempos de divergência relativamente recentes, entre milhares e  
356 alguns milhões de anos (BROWN et al., 1979).

357 O fato de apresentar todas as características descritas acima torna especialmente  
358 informativo para as questões ao nível de espécie, particularmente quando as relações  
359 filogenéticas dizem respeito a táxons intimamente relacionados (RUBINOFF, 2006) como, o  
360 estudo de duas espécies pertencentes à mesma família, ou até ao mesmo gênero.

361 O citocromo *c* oxidase é uma grande proteína transmembrana encontrada na  
362 mitocôndria e altamente conservada em espécies que empregam a fosforilação oxidativa para  
363 metabolismo. Ela é composta por 10 subunidades nucleares e 3 subunidades mitocondriais  
364 conhecidas como subunidades I, II e III. O citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) é a  
365 subunidade catalítica da enzima e se localiza predominantemente na crista da membrana  
366 mitocondrial (BERMAN et al, 2000; VOET; VOET; PRATT, 2014). É de se esperar um nível

367 significativo de restrição quanto às mudanças na forma estrutural da proteína, devido sua  
368 natureza catalítico-estrutural, no entanto, os nucleotídeos do gene que a codifica  
369 demonstraram uma variação suficiente para serem diferenciados entre espécies (WARD;  
370 HANNER; HEBERT, 2009). Isso ocorre em razão do código genético ser degenerado, ou  
371 seja, um mesmo aminoácido pode ser codificado por códons de bases nucleotídicas diferentes,  
372 permitindo que mutações ocorram em genes codificadores de proteínas (PIERCE, 2011).  
373 Deste modo, o COI apresenta uma baixa divergência intraespecífica, no entanto demonstra  
374 variação suficiente para ser distinto entre espécies (WAUGH, 2007).

375 Com base nisso, Hebert et al. (2003) propuseram a padronização do método por meio  
376 do uso de um fragmento de uma única sequência gênica para diferenciar todas, ou pelo menos  
377 a vasta maioria, das espécies animais. Esta metodologia foi chamada de DNA *barcode* em  
378 analogia ao sistema de identificação de produtos por códigos de barras. Assim, da mesma  
379 forma que um produto é reconhecido por sua combinação única de código de barras, uma  
380 espécie seria identificada por sua combinação única e exclusiva de nucleotídeos no fragmento  
381 de aproximadamente 650pb do gene COI. Os autores justificam a escolha desse gene devido à  
382 ampla gama de estudos já realizados com o mesmo, como: à existência de conjuntos robustos  
383 de *primers* universais desta região para a maioria dos filos animais; pelo fato desse gene  
384 apresentar um aparente melhor sinal filogenético; possuir uma alta taxa de mutação,  
385 aproximadamente três vezes maior que as dos genes ribossomais 12S e 16S e; maior eficácia  
386 na atribuição de indivíduos à categorias taxonômicas elevadas (filos, ordens), por meio da  
387 análise das substituições de aminoácidos.

388 A metodologia de DNA barcode vem contribuindo com a taxonomia, sistemática e  
389 genética de populações (RUBINOFF, 2006; GODFRAY, 2007; HAJIBABAEI et al. 2007;  
390 MILLER, 2007). Na taxonomia, o DNA *barcode* pode ser utilizado para identificar espécimes  
391 atípicos e contribuir para revisão da nomenclatura de vários grupos, assim como pode ser  
392 utilizado como método de rotina para auxiliar na identificação de espécies. Na genética de  
393 populações o DNA *barcode* pode fornecer um primeiro sinal sobre a extensão e natureza das  
394 divergências populacionais, o que facilitará os estudos comparativos da diversidade de várias  
395 espécies (PEREIRA, 2011).

396 Alguns trabalhos têm mostrado a eficiência do DNA *barcode* na detecção de novas  
397 espécies (HANDFIELD & HANDFIELD, 2006; SMITH et al., 2005; YASSIN, 2008). Esta  
398 técnica também apresentou uma resolução ao nível de espécies de uma ampla gama de táxons  
399 animais, incluindo formigas, morcegos, aves, borboletas, crustáceos, peixes e aranhas  
400 (HEBERT et al., 2004a, 2004b; BARRETT & HEBERT 2005, SMITH et al., 2005, WARD et

401 al., 2005, CLARE et al., 2007, COSTA et al., 2007). Atualmente, mais de 18,792 espécies de  
402 peixes foram codificadas com DNA *barcode* (Barcode of Life Database (BOLD),  
403 www.boldsystems.org, verificado em 11 de fevereiro de 2018). No que diz respeito às  
404 espécies de peixes, com o objetivo de facilitar a identificação por *DNA barcode*, grupos de  
405 trabalhos estão se unindo em prol de um banco de dados específico, “*Fish Barcoding of Life*”  
406 (www.fishbol.org), que visa estabelecer uma biblioteca com sequências de referência para o  
407 código de barras específico de todos os peixes (WARD; HANNER; HEBERT, 2009).

408 Uma das grandes vantagens desta técnica é na identificação de espécies a partir do  
409 ictioplâncton, uma vez que a classificação de ovos e larvas de peixes é extremamente  
410 complexa, devido às muitas das suas características morfológicas ainda não estarem  
411 desenvolvidas o suficiente para serem analisadas (PEGG et al., 2006; WARD; HANNER;  
412 HEBERT, 2009). Alguns trabalhos já demonstraram a eficiência da técnica na identificação  
413 de ictioplâncton (HUBERT et al. 2008; GLEASON & BURTON, 2012; GARCÍA-DÁVILA  
414 et al. 2014; GARCÍA-DÁVILA, et al. 2015; RODRIGUES et al. 2017). Alguns trabalhos  
415 demonstraram uma melhor resolução taxonômica utilizando o DNA barcode em ovos e larvas  
416 de peixes quando comparado com a taxonomia morfológica tradicional, mesmo quando foram  
417 aplicadas técnicas morfológicas refinadas (microscopia de luz e microscopia eletrônica de  
418 varredura) (SHAO; CHEN & WU, 2002; BECKER et al., 2015).

419 Hubert et al. (2015), avaliaram a eficácia do DNA *barcode* na identificação de larvas  
420 de peixes de recife de coral e, identificaram 75% das amostras ao nível de espécie.. Lima,  
421 (2015) obteve resultados bastante satisfatórios empregando a técnica de DNA *barcode*,  
422 podendo identificar 88,44% das amostras a nível específico ao estudar a variação espacial de  
423 produtos reprodutivos de peixes em zonas de influência de reservatórios no rio Paranapanema.  
424 Frantine-Silva et al. (2015), realizaram um estudo para identificar e classificar o ictioplâncton  
425 de afluentes e reservatórios ao longo do trecho médio do rio Paranapanema. E conseguiram  
426 estimar 37 espécies em 27 gêneros, 15 famílias e quatro ordens, por meio do DNA *barcode*. A  
427 similaridade para sequências depositadas no banco de dados foi superior a 99%,  
428 demonstrando a eficácia da metodologia na identificação de peixes sul-americanos e sua  
429 importância na obtenção de informações mais precisas e cruciais na elaboração de planos de  
430 conservação. Azmir et al., (2017) utilizaram DNA barcode para identificação de larvas de  
431 peixes em áreas de manguezais da Malásia Peninsular, conseguindo identificar todas as 177  
432 larvas a nível específico. Lin et al. (2016) realizaram a identificação de 8,933 ovos de peixe e  
433 12.161 larvas de peixes pela técnica DNA *barcode* durante o verão no Mar da China Oriental  
434 onde conseguiram classificar 45 e 124 táxons respectivamente

435

436 **REFERÊNCIAS**

437

438 AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO-JR, H.F.; BORGHEITI, J.R. Considerações sobre os impactos  
439 dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso:  
440 Reservatório de Itaipu. **Revista Unimar**, v.14, p.89-107. 1992

441 AGOSTINHO, A.A.; VAZZOLER, A.E.A.M.; THOMAZ, S.M. The high River Paraná  
442 Basin: limnological and ichthyological aspects, p.59-103. In: TUNDISI, J.G.; BICUDO,  
443 C.E.M.; MATSUMURA-TUNDISI, T. (Eds.). **Limnology in Brazil**. ABC/SBL, Rio de Janeiro,  
444 Janeiro, 1995.

445 AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO-JR, H.F. Peixes da bacia do alto rio Paraná, p. 374-400. In:  
446 LOWE-MCCONNELL, R.H. (Ed.) **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**.  
447 Edusp, São Paulo. 1999.

448 AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; VERÍSSIMO, S.; OKADA, E.K. Flood regime, dam  
449 regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction  
450 and recruitment. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.14, p.11-19. 2004.

451 AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. **O manejo da pesca em reservatórios da bacia do Alto**  
452 **rio Paraná: Avaliação e perspectivas**. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A.  
453 Ecologia de reservatório: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas. Rima,  
454 São Carlos – SP, p. 23-55: 2005.

455 AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e manejo de recursos**  
456 **pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: Eduem, 2007.

457 AGOSTINHO, A.A., PELICICE, F.M., & GOMES, L.C. Dams and the fish fauna of the  
458 Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. **Brazilian**  
459 **Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 1119-1132. 2008.

460 ALBERT, J.S.; REIS, R.E. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**.  
461 University of California Press: Berkeley. 2011. 388p.

462 ALLENDORF. F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**.  
463 Blackwell Publishing, 2007.

464 ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica. **Atlas de energia elétrica do Brasil**. 3ª  
465 Edição. Brasil: 2008.

466 ANTONIO, R.R. et al. Blockage of migration routes by dam construction: can migratory fish  
467 find alternative routes? **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 2, p. 177-184. 2007.

468 ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição  
469 para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C.  
470 **Biologia Molecular e Evolução** (Eds.). 2ª Ed. Ribeirão Preto. Editora Holos / Sociedade  
471 Brasileira de Genética: 2012

472 AZMIR, I.A. et al. Identification of larval fish in mangrove areas of Peninsular Malaysia  
473 using morphology and DNA barcoding methods. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 33, n.  
474 5, p. 998-1006, 2017.

475 BALIAN, E.V.; SEGERS, H.; LÉVÊQUE, C.; MARTENS, K. The Freshwater Animal  
476 Diversity Assessment: an overview of the results. **Hydrobiologia** v. 595, p. 627–637. 2008.

- 477 BAUMGARTNER, G.; NAKATANI, K.; CAVICCHIOLI, M.; & BAUMGARTNER,  
478 M.D.S.T. Some aspects of the ecology of fish larvae in the floodplain of the high Paraná river,  
479 Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14, n. 3, p. 551-563. 1997.
- 480 BECKER, R. A., SALES, N. G., SANTOS, G. M., SANTOS, G. B., & CARVALHO, D. C.  
481 DNA barcoding and morphological identification of neotropical ichthyoplankton from the  
482 Upper Paraná and São Francisco. **Journal of fish biology**, v. 87, n. 1, p. 159-168, 2015.
- 483 BEEBEE, T.; GRAHAM R. **An introduction to molecular ecology**. Oxford University  
484 Press, 2008.
- 485 BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG,  
486 H.; & BOURNE, P. E. **The protein data bank**. Nucleic acids research, 28(1), 235-242. 2000.
- 487 BIALETZKI A, NAKATANI K, SANCHES P.V. Larval fish assemblage in the Baía River  
488 (Mato Grosso do Sul State, Brazil): temporal and spatial patterns. **Environmental Biology of**  
489 **Fishes**, v. 73, p. 37-47. 2005.
- 490 BIG – ANEEL. Banco de Informações de Geração. Site:  
491 <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/capacidadebrasil.cfm> - acessado em  
492 09/08/2016 às 10:50h: 2016.
- 493 BILLINGTON, N.; HEBERT, P.D.N. Mitochondria DNA Diversity in Fishes and its  
494 implications for introductions. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48  
495 (Suppl. I), p. 80 – 94. 1991.
- 496 BROWNW, M.; GEORGE, R.M.; WILSON, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial  
497 DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.76, p.1967-1971. 1979.
- 498 BROWN, W.M. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction  
499 endonuclease analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.77, n.6,  
500 p.3605-3609. 1980.
- 501 BROWNW, M.; PRAGERA, E.M.; WANG, A.; WILSON A.C. Mitochondrial DNA  
502 sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, v.18,  
503 p.225-239. 1982.
- 504 CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; FERREIRA, K.M.; RIBEIRO, A.C.; 206  
505 BENINE, R.C.; DARDIS, G.Z.P.; MELO, A.L.A.; STOPIGLIA, R.; ABREU, T.X.; 207  
506 BOCKMANN, F.A.; CARVALHO, M.; GIBRAN, F.Z.; LIMA, F.C.T. Estrutura e  
507 composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota**  
508 **Neotropica**, v.3, n.1, p.1-14. 2003.
- 509 CLARE, E. L., LIM, B. K., ENGSTROM, M. D., EGER, J. L., & HEBERT, P. D. DNA  
510 barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. **Molecular**  
511 **Ecology Resources**, v. 7, n. 2, p. 184-190, 2007.
- 512 COSTA, F. O., DEWAARD, J. R., BOUTILLIER, J., RATNASINGHAM, S., DOOH, R. T.,  
513 HAJIBABAEI, M., & HEBERT, P. D. Biological identifications through DNA barcodes: the  
514 case of the Crustacea. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 64, n. 2, p.  
515 272-295, 2007.
- 516 COSTA, M.D.P.; & SOUZA-CONCEIÇÃO, J.M. Composição e abundância de ovos e larvas  
517 de peixes na baía da Babitonga, Santa Catarina, Brasil. **Pan-American Journal of Aquatic**  
518 **Sciences**, v. 4, n. 3, p. 372-382. 2009.

- 519 COSTA, A. D. A., FERREIRA, D. G., DA SILVA, W. F., ZANATTA, A. S., SHIBATTA, O.  
520 A., & Galindo, B. A. Fishes (Osteichthyes: Actinopterygii) from the Penacho stream, upper  
521 Paraná River basin, Paraná State, Brazil. **Check List**, v. 9, n. 3, p. 519-523, 2013.
- 522 DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A.H.; GESSNER, M.O.; KAWABATA, Z.I.; KNOWLER,  
523 D.J.; LÉVÊQUE, C.; NAIMAN, R.J.; PRIEUR-RICHARD, A.H.; SOTO, D.; STIASSNY,  
524 M.L.J.; SULLIVAN, C.A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and  
525 conservation challenges. **Biological Reviews**, v. 81, p. 163–182. 2006.
- 526 DUKE ENERGY. **Peixes do rio Paranapanema**. São Paulo: Editora Horizonte Geográfico.  
527 2008.
- 528 DUKE-ENERGY – Geração Paranapanema. **Peixes do rio Paranapanema – Edição**  
529 **revisada e ampliada**. Editora Horizonte Geográfico. São Paulo (SP): 2003.
- 530 DUKE-ENERGY. **Duke Energy Brasil**. Site: <http://www.duke-energy.com.br> – acessado em  
531 09/08/2016 às 11:30h: 2016.
- 532 FRANKHAM, R; BALLOU, J.D; BRISCOE, D.A. Fundamentos de Genética da  
533 Conservação.1.ed.**SBG (Sociedade Brasileira de Genética)** Ribeirão Preto, SP.280 p, 2008.
- 534 FRANTINE-SILVA, W.; SOFIA, S.H.; ORSI, M.L.; & ALMEIDA, F.S. DNA barcoding of  
535 freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. **Molecular**  
536 **ecology resources**, v. 15, p. 1226-1237. 2015.
- 537 FREELAND, J.R.; KIRK, H.; PETERSEN, S. Genetic Analysis of Single Populations.  
538 **Molecular Ecology**, Second Edition, p. 77-128, 2005.
- 539 GALINDO, B. A. **Aspectos da biodiversidade de peixes do rio Laranjinha – Sistema do**  
540 **Alto Rio Paraná**. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). UEL, Londrina. 2014
- 541 GALVES, W., SHIBATTA, O.A., & JEREP, F.C. Estudos sobre diversidade de peixes da  
542 bacia do alto rio Paraná: uma revisão histórica. Semina: **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.  
543 30, n. 2, p. 141-154. 2009.
- 544 GARCÍA-DÁVILA, C. R., CASTRO-RUIZ, D., SÁNCHEZ-RIBEIRO, H., ISMIÑO-ORBE,  
545 R. A., RENGIFO-TRIGOSO, D., GARCÍA-VÁSQUEZ, A., ... & RENNO, J. F. Diversidad  
546 de ictioplancton en los ríos Curaray, Arabela y Napo (Amazonía peruana). *Folia Amazónica*,  
547 v. 23, n. 1, p. 67-78, 2014.
- 548 GARCÍA-DÁVILA, C., CASTRO-RUIZ, D., RENNO, J. F., CHOTA-MACUYAMA, W.,  
549 CARVAJAL-VALLEJOS, F. M., SANCHEZ, H., ... & NÚÑEZ-RODRÍGUEZ, J. Using  
550 barcoding of larvae for investigating the breeding seasons of Pimelodid catfishes from the  
551 Marañon, Napo and Ucayali rivers in the Peruvian Amazon. **Journal of applied ichthyology**,  
552 v. 31, n. S4, p. 40-51, 2015.
- 553 GEIST, J. Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. **Ecological**  
554 **Indicators**, v. 11, p. 1507–1516. 2011.
- 555 GLEASON, L. U., & BURTON, R. S. High-throughput molecular identification of fish eggs  
556 using multiplex suspension bead arrays. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 1, p. 57-66,  
557 2012.
- 558 GODFRAY, H.C.J. Linnaeus in the information age. **Nature**, v. 446, p. 259–260. 2007.
- 559 GOGOLA, T.M et al. Spatial and temporal distribution patterns of ichthyoplankton in a  
560 region affected by water regulation by dams. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 8, n.  
561 2, p. 341-349. 2010.

- 562 GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C.S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e**  
563 **áreas adjacentes**. Editora EDUEM. Maringá – PR. 241p: 2007.
- 564 HAJIBABAEI, M. et al. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in  
565 biodiversity monitoring. **BMC Biology**, v.5, n.24, p.1-15. 2007.
- 566 HANDFIELD, D.; HANDFIELD, L. A new species of *Plusia* (Lepidoptera: Noctuidae) from  
567 North America. **Canadian Entomologist**, v. 138, p. 853–859. 2006.
- 568 HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J.R. Barcoding animal life:  
569 cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proc. R. Soc.**  
570 **Lond. B**, v. 270, p. S596-S599. 2003.
- 571 HEBERT, P. D., PENTON, E. H., BURNS, J. M., JANZEN, D. H., & HALLWACHS, W.  
572 Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly  
573 *Astrartes fulgerator*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of  
574 America, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004a.
- 575 HEBERT, P. D., STOECKLE, M. Y., ZEMLAK, T. S., & FRANCIS, C. M. Identification of  
576 birds through DNA barcodes. **PLoS biology**, v. 2, n. 10, p. e312, 2004b
- 577 HUBERT, Nicolas et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA  
578 barcodes. **PLoS one**, v. 3, n. 6, p. e2490, 2008.
- 579 HUBERT, N., ESPIAU, B., MEYER, C., & PLANES, S. Identifying the ichthyoplankton of a  
580 coral reef using DNA barcodes. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 1, p. 57-67, 2015.
- 581 HILSDORF, A.W. S.; PETRERE-JR, M. Conservação de peixes da Bacia do rio Paraíba do  
582 Sul. **Ciência Hoje**, v.30, p.62-67. 2002.
- 583 HOFFMANN, A.C., ORSI, M.L., & SHIBATTA, O.A. Diversidade de peixes do reservatório  
584 da UHE Escola Engenharia Mackenzie (Cativara), rio Paranapanema, bacia do alto rio  
585 Paraná, Brasil, ea importância dos grandes tributários na sua manutenção. **Iheringia, Série**  
586 **Zoológica**, v. 95, n. 3, p. 319-325. 2005.
- 587 HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome research**,  
588 v. 9, n. 9, p. 868-877. 1999
- 589 ITAIPU – BINACIONAL. Rio Paraná. Site: <https://www.itaipu.gov.br/energia/rio-parana> -  
590 acessado em 10/08/2016 às 10:30h: 2016.
- 591 JÚLIO-JR, H.F.; TOS, C.D.; AGOSTINHO, A.A.; PAVANELLI, C.S. A massive invasion of  
592 fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. **Neotropical**  
593 **Ichthyology**, v.7, p.709-718. 2009.
- 594 KIPPER, D.; BIALETZKI, A.; & SANTIN, M. Composição Taxonômica da assembleia de  
595 larvas de peixes no reservatório de Rosana, Rio Paranapanema, Brasil. **Biota Neotropica**, v.  
596 11, n. 1, p. 421-426. 2011.
- 597 LANGEANI, F.; CASTRO, R.M.C.; OYAKAWA, O.T.; SHIBATTA, O.A.; PAVANELLI,  
598 C.S.; CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e  
599 perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v.7, n.3, p.1-17. 2007.
- 600 LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M.L.J.; TEDESCO, P.A.  
601 Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, v.595, p.545–567. 2008.
- 602 LIMA S.C. **Identificação molecular e variação temporal de ovos e larvas de peixes**  
603 **(Teleostei: Osteichthyes) em zonas de influência de reservatórios no rio Paranapanema**.  
604 Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). UEL, Londrina. 2015

- 605 LIN, H. Y., CHIU, M. Y., SHIH, Y. M., CHEN, I. S., LEE, M. A., & SHAO, K. T. Species  
606 composition and assemblages of ichthyoplankton during summer in the East China  
607 Sea. **Continental Shelf Research**, v. 126, p. 64-78, 2016.
- 608 LOPES, C.M., ALMEIDA, F.S., ORSI, M.L., BRITTO, S.G.D.C., SIROL, R.N. & SODRÉ,  
609 L.M.K. Fish passage ladders from Canoas Complex- Paranapanema River: evaluation of  
610 genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis*(Teleostei: Characiformes).  
611 **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 2, p. 131-138. 2007.
- 612 LOWE-McCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São  
613 Paulo: EDUSP, 534 p. 1999.
- 614 MAACK, R. **Geografia física do Paraná**. 3. ed. Curitiba: Imprensa Oficial, 440p. 2002.
- 615 MACARTHUR, R.H. & WILSON, E.O. **The Theory of Island Biogeography**. New Jersey,  
616 Princeton University Press, 1967.
- 617 MATARESE, A.C.; BLOOD, D.M.; PICQUELLE, S.J.; & BENSON, J.L. Atlas of  
618 abundance and distribution patterns of ichthyoplankton from the Northeast Pacific Ocean and  
619 Bering Sea ecosystems: based on research conducted by the Alaska Fisheries Science Center.  
620 (1972–1996). 2003
- 621 MILLER, S.E. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. **Proceedings of the**  
622 **National Academy of Sciences**, v. 104, n. 12, p. 4775–4776. 2007.
- 623 MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. **Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-**  
624 **catalyzed chain reaction Methods Enzymol**. V. 155, p. 335-50. 1987
- 625 NAKATANI, K, BIALETZKI A, SANTIN M, et al. Ocorrência e abundância de larvas e  
626 juvenis de peixes em reservatórios. In: **Biocenoses em reservatórios: padrões espaciais e**  
627 **temporais**. (eds. Rodrigues L, Thomaz SM, Agostinho AA, *et al.*), p. 253-268. Rima, São  
628 Carlos, São Paulo. 2005
- 629 NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.;  
630 SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; & PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de**  
631 **água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001.
- 632 NAKATANI, K.; BAUMGARTNER, G.; CAVICCHIOLI, M. Ecologia de ovos e larvas de  
633 peixes. **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e**  
634 **socioeconômicos**. EDUEM, Maringá, p. 281-306, 1997.
- 635 NEIRA, F.J.; & KEANE, J.P. Ichthyoplankton-based spawning dynamics of blue mackerel  
636 (*Scomber australasicus*) in south-eastern Australia: links to the East Australian Current.  
637 **Fisheries Oceanography**, v. 17, n. 4, p. 281-298. 2008.
- 638 NELSON, Joseph S.; GRANDE, Terry C.; WILSON, Mark V.H. **Fishes of the World**. John  
639 Wiley & Sons, 2016.
- 640 NILSSON, C.; REIDY, C.A.; DYNESIUS, M.; REVENGA, C. Fragmentation and flow  
641 regulation of the world's large river systems. **Science**, v.308, p.405-408. 2005.
- 642 ORSI, M.L. **Estratégias reprodutivas de peixes: Estratégias reprodutivas de peixes da**  
643 **região média-baixa do rio Paranapanema, reservatório de Capivara**. São Paulo: Blucher,  
644 2010.
- 645 PAULA, F.M. **Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) das**  
646 **escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do Complexo Canoas, Rio**  
647 **Paranapanema**. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia

- 648 Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do  
649 título de Mestre em Genética e Biologia Molecular. 2006.
- 650 PEGG, G. G.; SINCLAIR, B.; BRISKEY, L.; & ASPDEN, W. J. MtDNA barcode  
651 identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef , **Australia. Scientia Marina**,  
652 v. 70, p. 7-12, 2006.
- 653 PELICICE, F.M.; AGOSTINHO, A.A. Fish-Passage Facilities as Ecological Traps in Large  
654 Neotropical Rivers. **Conservation Biology**, v.22, n.1, p.180-188. 2008.
- 655 PEREIRA, L.H.G. **Identificação Molecular dos Peixes da bacia do Alto rio Paraná**. 2011.  
656 p. 178. Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual  
657 Paulista, 2011.
- 658 PETRERE JR, M. Fisheries in large tropical reservoirs in South America. **Lakes &**  
659 **Reservoirs: Research & Management**, v. 2, n. 1-2, p. 111-133. 1996.
- 660 PIERCE, B. A. Genética um enfoque conceitual. Guanabara Koogan, 2011.
- 661 POFF, N.L.; ALLAN, J.D.; BAIN, M.B.; KARR, J.R.; PRESTEGAARD, K.L.; RICHTER,  
662 B.D.; SPARKS, R.E.; STROMBERG, J.C. The natural flow regime. **BioScience**, v.47, p.769-  
663 583 784. 1997.
- 664 POMPEU, P.S; NOGUEIRA, L.B; GODINHO, H.P; MARTINEZ, C.B. Downstream Passage  
665 Of fFish Larvae And Eggs Through A Small-Sized Reservoir, Mucuru River, Brazil. **Zoologia**  
666 v. 28, n. 6, p. 739-749. 2011.
- 667 PONTON, D.; VAUCHEL, P. Immediate downstream effects of the Petit-Saut Dam on young  
668 neotropical fish in a large tributary of the Sinnamary River (French Guiana, South America).  
669 **Regulated Rivers: Research and Management**, v.14, p.227-243. 1998.
- 670 RÉ, P. **Ictioplâncton do estuário do Tejo**. Resultados de 4 anos de estudo (1979/1981).  
671 Arquivos do Museu Bocage (série A), v. 2, n. 9, p. 145-174. 1984.
- 672 RÉ, P. **Ictioplâncton estuarino da Península Ibérica: guia de identificação dos ovos e**  
673 **estados larvares planctônicos**. Cascais: Câmara Municipal de Cascais, 1999.
- 674 REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JUNIOR, C.J. (Org.) **Check list of the**  
675 **freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDPUCRS, 2003.
- 676 RODRIGUES, T., HILSDORF, A. W. S., PIMENTA, E. G., & DE AMORIM, A. F.  
677 Ocorrência e identificação de larvas de Istiophoridae e ovos de Xiphiidae na costa sudeste  
678 brasileira. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 1, p. 78-86, 2017.
- 679 RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation.  
680 **Conservation Biology**, v. 20, n. 4, p. 1026-1033. 2006.
- 681 SCHAEFFER, S.A. Conflict an Resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the  
682 neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.;  
683 VARI, R.P.; LUCENA, Z.M. S. & LUCENA, C.A.S. **Phylogeny and classification of**  
684 **Neotropical fishes**. Porto Alegre, EDIPUCRS, p.375-400, 1998.
- 685 SEMA - BACIAS HIDROGRÁFICAS DO PARANÁ. **Secretaria de Estado do Meio**  
686 **Ambiente e Recursos Hídricos**, 2010.
- 687 SHAO, K. T., CHEN, K. C., & WU, J. H. Identification of marine fish eggs in Taiwan using  
688 light microscopy, scanning electric microscopy and mtDNA sequencing. **Marine and**  
689 **Freshwater Research**, v. 53, n. 2, p. 355-365, 2002.

- 690 SHIBATTA, O.A.; ORSI, M.L.; BENNEMANN, S.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Diversidade e  
691 distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.;  
692 SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina, Paraná: 2002.
- 693 SHIBATTA, O. A.; GEALH, A. M.; BENNEMANN, S. T. Ictiofauna dos trechos alto e  
694 médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, 2007.
- 695 SMITH, D.L., JOHNSON K.B. **A Guide to marine Coastal Plankton and Marine**  
696 **Invertebrate Larvae**. 2nd Ed. Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company. 1996. 221p.
- 697 SMITH, M.A.; WOODLEY, N.E.; JANZEN, D.H.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P.D.N.  
698 DNA barcode reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a  
699 genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). **Proceedings of the National Academy of**  
700 **Sciences, USA**, v. 103, p. 3657–3662. 2006.
- 701 SODRÉ, L.M.K.; ALMEIDA, F.S.; CHIARI, L. **Estudos sobre a variabilidade genética de**  
702 **peixes do rio Tibagi através de marcadores moleculares**. In: MEDRI, M. E. et al. A bacia  
703 do Rio Tibagi. Londrina, cap. 28, p. 531-550. 2002.
- 704 SOLÉ-CAVA, A.J. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S. R.  
705 (Ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, cap. 17, p. 171-190. 2001.
- 706 SOUZA, R.C.R. **Distribuição e composição do Ictioplâncton no reservatório de Três**  
707 **Marias**, MG, Brasil. 2013. 131p. Dissertação de mestrado. – Lavras: UFLA, 2013.
- 708 STEVAUX, J.C.; SOUZA FILHO, E.E.; JABUR, I.C. A história quaternária do rio Paraná em  
709 seu alto curso. **A Planície De Inundação Do Alto Rio Paraná**. UEM-Nupelia, Maringá-PR,  
710 1997.
- 711 STRAYER, D.L. & DUDGEON, D. Freshwater biodiversity conservation: recent progress  
712 and future challenges. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 29, p. 344–  
713 358. 2010.
- 714 VIANNA, N.C.; NOGUEIRA, M. G. Ichthyoplankton and limnological factors in the Cinzas  
715 River – an alternative spawning site for fishes in the middle Paranapanema River basin,  
716 Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 20, p. 139-151: 2008.
- 717 VOET, D.; VOET, J. G.; & PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível**  
718 **Molecular**. Artmed Editora, 2014.
- 719 VRIJENHOEK, R.C. Conservation genetics of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v.  
720 53, s. A, p. 394-412. 1998.
- 721 WARD, R.D.; HANNER, R.; HEBERT, P.D.N. The campaign to DNA barcode all fishes,  
722 FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p329-356. 2009.
- 723 WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays:**  
724 **News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 29, p. 188-97,  
725 2007.
- 726 WRIGHT, D.H. Species-Energy Theory: An Extension of Species-Area Theory. **Oikos**. v. 41,  
727 p. 496-506. 1983.
- 728 YASSIN, A.; CAPY, P.; MADI-RAVAZZI, L.; OGEREAU, D.; DAVID, J.R. DNA barcode  
729 discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid  
730 *Zaprionus indianus*. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 491-501. 2008.

## 2. OBJETIVO GERAL

Devido à rica diversidade em espécies de peixes nos principais tributários do reservatório de Capivara, o presente trabalho teve como objetivo realizar a identificação dos ovos coletados no rio das Cinzas e rio Tibagi com intuito de avaliar a composição e abundância do ictioplâncton, e fornecer informações sobre quais espécies de peixes estão se reproduzindo nessas bacias consideradas importantes para manutenção da biodiversidade do rio Paranapanema.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fazer uma análise de ovos de peixes pela técnica DNA *barcode* no rio das Cinzas e no rio Tibagi, que apresentaram uma maior diversidade de espécies em trabalhos anteriores relacionados a reservatórios do rio Paranapanema
- Obter maiores informações sobre a estimativa da diversidade desses tributários, sobre o processo de recrutamento, bem como sobre locais de desova das espécies de peixes.

1 **CAPÍTULO 1: Uso do DNA *barcode* na identificação de ovos de peixes nos tributários**  
2 **da UHE Capivara, bacia do rio Paranapanema.**

3  
4 M. C. C. LIMA<sup>1</sup> e F.S. ALMEIDA<sup>1</sup>

5 Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências  
6 Biológicas, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, 86057-970,  
7 Londrina-PR, Brasil.

8  
9 **RESUMO**

10  
11 A identificação correta do ictioplâncton em áreas influenciadas por reservatórios é  
12 imprescindível para traçar medidas de conservação eficazes, uma vez que permite a detecção  
13 de áreas de desova e o monitoramento de unidades populacionais de peixes afetadas por essas  
14 construções. O rio Paranapanema possui ao longo de sua calha principal 11 Usinas  
15 Hidrelétricas, a maior destas é a UHE Capivara, que possui como maiores tributários os rios  
16 Tibagi e Cinzas. Identificação do ictioplâncton em reservatórios do rio Paranapanema  
17 utilizando o DNA *barcode* observaram uma maior diversidade para o reservatório Capivara,  
18 bem como para seus principais tributários. Portanto, o trabalho teve como objetivo, a  
19 identificação de ovos de peixes nos rios Tibagi e Cinzas utilizando a técnica de DNA *barcode*  
20 a fim de obter informações sobre a estimativa da diversidade, processo de recrutamento e  
21 locais de desova. Das 928 sequências analisadas, 99,78% puderam ser indentificadas a nível  
22 específico quando confrontadas com o banco de dados Boldsystems<sup>®</sup>, demonstrando alta taxa  
23 de sucesso para a identificação dos ovos, que é um estágio de difícil identificação por  
24 caracteres morfológicos e que possui poucos estudos de identificação, principalmente no  
25 ambiente de água doce da região Neotropical. As amostras resultaram em 25 espécies, 11  
26 famílias e 2 ordens. Das 25 espécies encontradas, mais da metade (60%) possuem hábito de  
27 deslocamento reprodutivo, indicando que os afluentes desse reservatório estão sendo  
28 utilizados como rota migratória por estas espécies. Além disso, foram encontrados ovos de  
29 espécies raras e ameaçadas de extinção para o médio Paranapanema, indicando estes  
30 tributários como área de desova para estas espécies. Os resultados deste estudo demonstraram,  
31 a importância da identificação de ovos de peixes em ambientes influenciados por  
32 reservatórios para reconhecer as áreas de reprodução de espécies nativas e ameaçadas, bem  
33 como a importância dos rios Tibagi e Cinzas para a manutenção de espécies nativas do rio  
34 Paranapanema

35  
36  
37 **Palavras-chave:** Alto rio Paraná; Reservatórios, Conservação, Água doce, Neotropical.

38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  

---

<sup>1</sup> Autor Correspondente: Moema Cristina Costa de Lima;  
E-mail: moemauenp@gmail.com

47

## 48 **INTRODUÇÃO**

49           A bacia do rio Paraná é a segunda maior em termos de área de drenagem na América  
50 do Sul e vem sendo transformada na maior fonte de geração de energia hidrelétrica do Brasil  
51 por meio da construção de barragens (Agostinho et al. 1995; Agostinho et al. 2002). Os  
52 barramentos são uma das principais ameaças à biodiversidade em ambientes de água doce  
53 (Agostinho et al. 2005, Agostinho et al. 2008; Dudgeon et al. 2006), devido a incapacidade de  
54 algumas espécies sobreviver em corpos d'água represado, em razão da perda de habitats  
55 propícios para reprodução, comprometimento da migração reprodutiva e fragmentação  
56 populacional.

57           O rio Paranapanema, um dos principais afluentes do rio Paraná (Duke Energy, 2003)  
58 possui, atualmente, ao longo de sua calha principal 11 Usinas Hidrelétricas, num sistema de  
59 reservatórios em cascata, sendo a maior a UHE Capivara (Big - Aneel, 2016). Os principais  
60 tributários do reservatório de Capivara são os rios Tibagi e Cinzas, considerados importantes  
61 para a manutenção da biodiversidade da ictiofauna local. Por serem ambientes lóticos e  
62 semelhantes à bacia original, oferecem condições adequadas que auxiliam na manutenção das  
63 espécies (Dias et al. 2004; Hoffmann, Orsi & Shibatta 2005; Agostinho et al. 2007; Lopes et  
64 al. 2007; Vianna & Nogueira 2008; Orsi, 2010).

65           Estudos sobre a distribuição, identificação e abundância do ictioplâncton em  
66 reservatórios são importantes para o entendimento da ecologia e da dinâmica populacional  
67 (Nakatani et al. 1997), uma vez que, se mostra eficiente na avaliação do recrutamento das  
68 comunidades de peixes, já que adição de novos membros à população, por meio da  
69 reprodução, é um ponto crucial na biologia de populações de peixes (Nakatani et al. 2001).  
70 No entanto, a classificação destes produtos reprodutivos é extremamente complexa, uma vez  
71 que muitas das suas características morfológicas ainda não estão desenvolvidas o suficiente  
72 para serem analisadas, além de ser extremamente laborioso e demandar certo tempo (Pegg et

73 al. 2006; Ward et al., 2009). A tarefa é ainda mais problemática para os ovos, devido ao seu  
74 pequeno tamanho (1 mm) e similaridade entre as espécies, deste modo, a identificação por  
75 caracteres morfológicos não inclui este estágio, justamente pela impossibilidade de identificá-  
76 los na maioria dos casos (Richards, 2006)

77 O uso de marcadores moleculares com o intuito de discriminar corretamente as  
78 espécies, têm sido de extrema importância. Dentre as ferramentas moleculares, as baseadas  
79 em DNA mitocondrial têm se destacado ao longo dos últimos anos, especialmente a técnica  
80 proposta por Hebert et al. (2003), conhecida como DNA *barcode*. Este marcador apresenta  
81 uma baixa divergência intraespecífica, no entanto demonstra variação suficiente para ser  
82 distinto entre espécies (Waugh, 2007).

83 Uma das grandes vantagens desta técnica na resolução de espécies a partir do  
84 ictioplâncton, é que ela pode ser aplicada a organismos em seus diferentes estágios do ciclo de  
85 vida, incluindo ovos (Stoeckle et al. 2003). Alguns estudos já demonstraram a eficiência da  
86 técnica na identificação de ovos e larvas de peixes (Hubert et al. 2008; Gleason & Burton,  
87 2012; García-Dávila et al. 2014; García-Dávila, et al. 2015; Rodrigues et al. 2017). Frantini-  
88 Silva et al. (2015) e Lima, (2015), ao identificarem ictioplâncton pela técnica DNA *barcode*  
89 em reservatórios do rio Paranapanema observaram que o de Capivara apresentava a maior  
90 diversidade de espécies quando comparado aos demais reservatórios, bem como seus  
91 principais tributários, rio Tibagi e Cinzas.

92 Devido à maior diversidade de espécies, o presente estudo visa identificar ovos de  
93 peixes coletados em três períodos consecutivos de piracemas no rio Tibagi e no rio das Cinzas  
94 por meio da técnica DNA *barcode*, a fim de obter maiores informações sobre a estimativa da  
95 diversidade desses tributários, sobre o processo de recrutamento, bem como sobre os locais de  
96 desova das espécies de peixe.

97 **MATERIAL E MÉTODOS**

98 **Amostragem de ovos**

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

As amostragens foram realizadas em dois principais tributários do lado esquerdo do reservatório de Capivara, o rio Tibagi e o rio das Cinzas durante três períodos de piracema (outubro de 2012 a março de 2013, setembro de 2013 a março de 2014 e setembro de 2014 a março de 2015). Os pontos de estudo na bacia do rio Tibagi foram representados pelo seu subafluente (rio Congonhas - 23°04'04,31"S 50°51'32,56"O) e a porção baixa da sua calha principal (Jataizinho - 23°23'28,05"S 50°59'45,08"O), e os pontos na bacia do rio das Cinzas foram a porção média (23°04'32,75"S 50°21'49,70"O) e baixa da sua calha principal (22°56'14,82"S 50°31'40,60"O). A distribuição projetada para os trechos de amostragem pode ser observada na Figura 1.

109

110

111

112

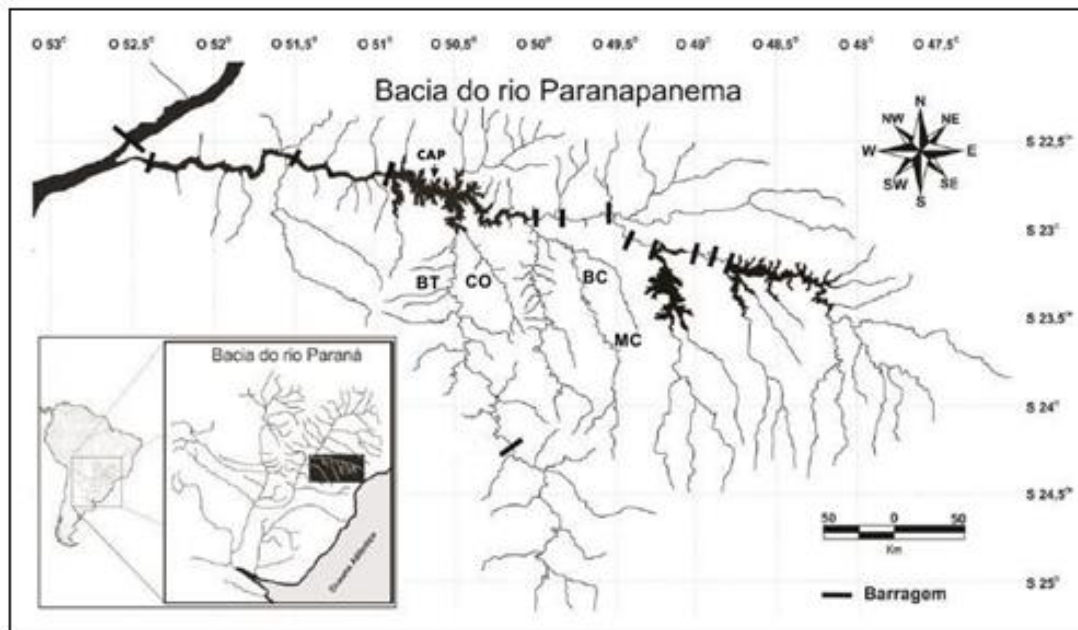
113

114

115

Em cada uma das localidades foram realizadas amostragens às 8h e às 20h. Em cada amostragem foram realizadas três repetições de dez minutos, duas próximas à zona litorânea e uma direcionada para calha central do rio. Em cada repetição foram utilizadas duas redes cônicas de malha 0,5mm e 1,6m de comprimento, que permaneceram cerca de 20 cm abaixo da superfície da água até o fim do tempo de repetição. As amostras coletadas foram armazenadas imediatamente em álcool 98% e posteriormente estocadas à -20°C.

116



**Figura**  
**I.**  
 Mapa  
 da  
 bacia  
 hidrogr  
 áfica do  
 rio  
 Paranap  
 anema  
 com os

128 trechos de amostragem, reservatório de Capivara (CAP), baixo rio Tibagi (BT), rio Congonhas (CO), Baixo rio  
 129 das Cinzas (BC) e médio rio das Cinzas (MC).

130

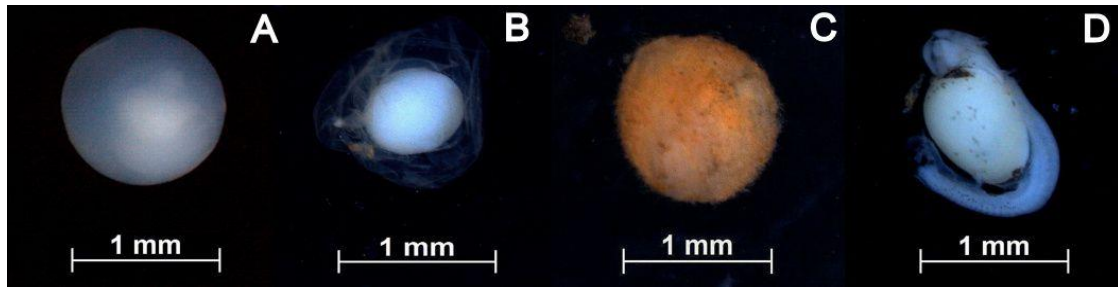
### 131 **Triagem e Foto documentação**

132 Em laboratório foi realizada a triagem das amostras coletadas com auxílio de uma lupa  
 133 estereoscópica. Uma parcela do material total coletado foi selecionada para o estudo, onde  
 134 foram utilizados apenas ovos, de morfotipos diferentes. Para os ovos analisados, foi realizada  
 135 uma foto documentação onde cada ovo possui uma foto correspondendo a um ID  
 136 (identificação) único com barra de escala para referenciar o seu tamanho, sendo utilizado  
 137 como voucher para as sequencias adquiridas posteriormente (Figura 2).

138

139

140



141

142 **Figura 2.** Morfotipos de ovos definidos à priori. A: ovo com espaço perivitelino reduzido (ID: 14J), B: espaço  
 143 perivitelino desenvolvido (ID: 1405Ac), C: ovo com matéria orgânica colada (ID: 1411Ac) e D: ovo eclodido  
 144 (ID: 1427Ac).

145

### 146 **Extração do DNA**

147 Para a extração do DNA os ovos foram alocados em placas de 96 poços com 150  $\mu\text{L}$   
 148 de tampão de extração. Cada 150  $\mu\text{L}$  de tampão de extração contem 20mg de Chelex100  
 149 (BIO-RAD), 0,1 $\mu\text{g}$  de proteinase K (Invitrogen) e 150  $\mu\text{L}$  de água ultrapura autoclavada. As  
 150 placas foram vedadas, colocadas no termociclador e mantidas à 63°C por 55 min e aquecidas  
 151 à 90°C por 5 min. O sobrenadante foi retirado e utilizado para amplificação. As placas foram  
 152 armazenadas com suas respectivas identificações em freezer à -20°C.

153

### 154 **Amplificação do gene COI**

155 A amplificação da região COI foi realizada com os *primers* FishF1 5'-TCA ACC AAC  
 156 CAC AAA GAC ATT GGC AC -3' e FishR1 5'- AGA CTT CTG GGT GGC CAA AGA  
 157 ATC A -3' (Ward et al. 2005). A amplificação foi efetuada em volume final de 10  $\mu\text{L}$ , sendo  
 158 3,6  $\mu\text{L}$  de água ultra pura, 5  $\mu\text{L}$  de kit PCR Go taq® Green Master Mix (Promega), 0,2  $\mu\text{L}$  de  
 159 cada primer (20  $\mu\text{M}$ ), 0,1  $\mu\text{L}$  de DNA. O programa utilizado foi: desnaturação inicial de 5  
 160 min à 94°C; 35 ciclos de 94°C por 30s, 54°C por 45s e 72°C por 2 min, com extensão final de  
 161 10 min à 72°C em termociclador MJ Research PTC-100. Os segmentos de DNA amplificados  
 162 foram corados com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies) e visualizados em gel  
 163 de agarose 1%.

## 164 **Purificação e sequenciamento**

165 Os produtos de amplificação foram purificados utilizando o kit de Purificação de PCR  
166 ExoSAP-IT GE Helthcare Bio-Sciences Ltd, segundo protocolo do fabricante, visando à  
167 eliminação de possíveis interferentes. As amostras purificadas foram sequenciadas em reações  
168 de 10 µL contendo 1 µL de tampão BigDye (400 mM Tris-HCl pH 9.0 e 10 mM MgCl<sub>2</sub>), 2  
169 µL de BigDye Terminator v. 3.1. Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Carls- bad, CA,  
170 USA), 0,25 µL de *primer* FishF1 (20µM) e água para completar o volume. Os produtos das  
171 reações foram sequenciados e analisados no sequenciador automático ABI-PRISM 3500 XL  
172 (Applied Biosystems).

173

## 174 **Análise dos dados**

175 As sequências de COI foram obtidas somente da fita forward, com tamanho superior a  
176 600pb e a qualidade das sequencias foi verificada por meio do aplicativo online  
177 Electropherogram Quality Analysis (Togawa & Brigido 2003) disponível em  
178 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>).

179 Todas as sequências foram submetidas ao banco de dados BOLD (Ratnasingham &  
180 Hebert, 2007) (<http://www.boldsystems.org/>), a fim de verificar a correspondência e  
181 similaridade das sequências submetidas com as armazenadas no banco de dados. As  
182 sequências depositadas com as melhores correspondências para cada táxon (>99%),  
183 juntamente com as sequências das amostras analisadas foram incorporadas às análises de  
184 distância genética intraespecífica e interespecífica, baseada no modelo de evolução Kimura-2-  
185 Parâmetros (K2P) (Kimura, 1980).

186 O mesmo modelo foi aplicado para a construção de uma árvore de distância genética  
187 pelo método Neighbor-Joining (NJ), visando obter uma representação gráfica da distribuição  
188 das distâncias genéticas entre os táxons. As análises de distância e a identificação do segundo

189 táxon com a menor distância interespecífica (vizinho mais próximo), bem como a árvore de  
190 Neighbor-Joining foram realizadas por meio do programa MEGA v6.0 (Tamura et al., 2013).  
191 Correspondências para sequências depositadas no Boldsystems com similaridade  $\geq 99\%$   
192 determinaram espécie, aquelas de  $\leq 98,9\%$  a  $\geq 94\%$  definiram o gênero e similaridades  
193 inferiores a 94% definiram a nível de família, baseados em Frantine-Silva *et al.* (2015).

194

## 195 **RESULTADOS**

196

### 197 **Identificação Molecular e Distância Genética**

198 Com base na similaridade entre as sequências das amostras e as sequências disponíveis  
199 no banco de dados, foi possível identificar 926 dos 928 ovos analisados (99,78 %) a nível de  
200 espécie, com similaridade média  $> 99\%$ . Dos 928 ovos analisados 528 foram provenientes do  
201 tributário rio das Cinzas e 400 do rio Tibagi.

202 A análise de similaridade das sequências resultou em 2 ordens, 11 famílias, 18 gêneros  
203 e 25 espécies. Dentre as 928 amostras, 274 foram distribuídas em 16 espécies da ordem  
204 Characiformes (64%) e 654 em 9 espécies da ordem Siluriformes (36%). Apenas 2 espécimes  
205 puderam ser discriminados apenas a nível de família com similaridade média de (91,62%),  
206 ambas representadas pela família Heptapteridae (Tabela 1)

207 **Tabela 1.** Espécies identificadas a partir de ovos provenientes dos principais tributário do reservatório de Capivara. N: Número de capturas; BOLD (%): Média das  
 208 similaridades para o táxon mais próximo encontradas através do Sistema de Identificação Boldsystems®; D (%): Média de distância genética dentro dos grupos; VP (%):  
 209 Vizinho mais próximo; DVP (%): Distância para o táxon mais próximo; EP (%): Erro padrão. Índices de similaridade considerados neste estudo: 99 – 100% correspondência  
 210 específica; 94 – 98,9% congênica; < 94 % correspondência ao nível de família. Táxons que não puderam ser identificadas com base apenas no índice de similaridade BOLD  
 211 (\*\*\*) correspondência <94 % níveis baseados em Frantine-Silva et al. (2015).

Espécie	N	BOLD-IDS	D± EP	VP	DVP±EP
<b>CHARACIFORMES</b>					
<b>Anostomidae</b>					
<i>Leporellus vittatus</i> (Valenciennes, 1850)	3	99,95 ± 0,06	0,08 ± 0,09	<i>Apareiodon affinis</i>	17,27 ± 1,85
<i>Leporinus friderici</i> (Bloch, 1794)	164	99,97 ± 0,01	0,10 ± 0,05	<i>Leporinus octofasciatus</i>	6,69 ± 1,11
<i>Leporinus octofasciatus</i> Steindachner, 1915	1	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Leporinus friderici</i>	6,69 ± 1,11
<i>Leporinus striatus</i> Kner, 1858	2	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Leporinus friderici</i>	14,86 ± 1,65
<i>Megaleporinus macrocephalus</i> Garavello & Britski, 1988	18	99,92 ± 0,02	0,12 ± 0,09	<i>Megaleporinus piavussu</i>	12,91 ± 1,70
<i>Megaleporinus obtusidens</i> (Valenciennes, 1837)	8	99,98 ± 0,02	0,04 ± 0,04	<i>Megaleporinus piavussu</i>	4,59 ± 0,87
<i>Megaleporinus piavussu</i> Britski, Birindellii & Garavello, 2012	2	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Megaleporinus obtusidens</i>	4,59 ± 0,87
<b>Characidae</b>					
<i>Astyanax lacustris</i> (Lütken, 1875)	5	99,84 ± 0,11	0,39 ± 0,15	<i>Astyanax schubarti</i>	16,39 ± 2,02
<i>Astyanax schubarti</i> Britski, 1964	1	99,50 ± 0	0,51 ± 0,28	<i>Astyanax lacustris</i>	16,39 ± 2,02
<b>Crenuchidae</b>					
<i>Characidium zebra</i> Eigenmann, 1909	1	99,82 ± 0	0,18 ± 0,18	<i>Leporellus vittatus</i>	21,20 ± 2,14
<b>Curimatidae</b>					
<i>Cyphocharax nagelii</i> (Steindachner, 1881)	7	99,97 ± 0,03	0,04 ± 0,04	<i>Steindachnerina insculpita</i>	12,93 ± 1,69
<i>Steindachnerina insculpita</i> (Fernández-Yépez, 1948)	1	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Cyphocharax nagelii</i>	12,93 ± 1,69
<b>Parodontidae</b>					
<i>Apareiodon affinis</i> (Steindachner, 1879)	3	99,94 ± 0,06	0,18 ± 0,12	<i>Leporellus vittatus</i>	17,27 ± 1,85
<b>Prochilodontidae</b>					
<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)	1	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Leporinus octofasciatus</i>	17,05 ± 1,85
<b>Serrasalminidae</b>					
<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887)	2	100 ± 0	0,34 ± 0,19	<i>Megaleporinus piavussu</i>	17,81 ± 1,87
<b>Triporthidae</b>					

<i>Triportheus nematurus</i> (Kner, 1858)	<b>55</b>	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Prochilodus lineatus</i>	20,58 ± 2,07
<b>SILURIFORMES</b>					
<b>Heptapteridae**</b>	<b>2</b>	91,62 ± 0,09	0,17 ± 0,16	<i>Pseudopimelodus mangurus</i>	21,52 ± 2,13
<b>Pimelodidae</b>					
<i>Iheringichthys labrosus</i> (Lütken, 1874)	<b>5</b>	99,93 ± 0,04	0,09 ± 0,09	<i>Pimelodus microstoma</i>	6,25 ± 1,02
<i>Megalonema platanum</i> (Günther, 1880)	<b>1</b>	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Pimelodus microstoma</i>	15,91 ± 1,78
<i>Pimelodus maculatus</i> Lacepède, 1803	<b>374</b>	99,99 ± 0	0,16 ± 0,09	<i>Pimelodus microstoma</i>	6,24 ± 1,08
<i>Pimelodus microstoma</i> Steindachner, 1877	<b>116</b>	99,97 ± 0,01	0,21 ± 0,07	<i>Pimelodus maculatus</i>	6,24 ± 1,08
<i>Pimelodus sp</i>	<b>73</b>	99,99 ± 0	0,02 ± 0,01	<i>Pimelodus maculatus</i>	15,7 ± 1,74
<i>Pinirampus pirinampu</i> (Spix & Agassiz, 1829)	<b>16</b>	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Iheringichthys labrosus</i>	16,18 ± 1,73
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> (Spix & Agassiz, 1829)	<b>16</b>	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Sorubim lima</i>	10,80 ± 1,33
<i>Sorubim lima</i> (Bloch & Schneider, 1801)	<b>47</b>	99,96 ± 0,01	0,16 ± 0,10	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	10,80 ± 1,33
<b>Pseudopimelodidae</b>					
<i>Pseudopimelodus mangurus</i> (Valenciennes, 1835)	<b>4</b>	100 ± 0	0,00 ± 0,00	<i>Pimelodus sp</i>	19,75 ± 2,00

212 Das 25 espécies identificadas, 24 estão presentes na lista das espécies documentadas  
 213 para o rio Paranapanema representando, assim, 15,48% de um total de 155 espécies. Apenas  
 214 *Triportheus nematurus* não está documentada para o rio Paranapanema.

215 Os fragmentos amplificados tiveram uma média de 600pb com boa qualidade, sem  
 216 evidências de inserções, deleções ou códon de parada. As distâncias baseadas em K2P  
 217 mostraram um aumento proporcional de valores de acordo com o aumento do nível  
 218 taxonômico analisado, variando entre 0% e 0,51% (média 0,10%), para as comparações  
 219 intraespecífica, e entre 0,76% e 7,25% (média 5,06%) para as comparações congênicas,  
 220 entre 4,63% e 7,85% (média 6,31%) para as comparações dentro de família e entre 8,15% e  
 221 12,98% (média 10,57%) para as comparações entre ordens (Tabela 2).

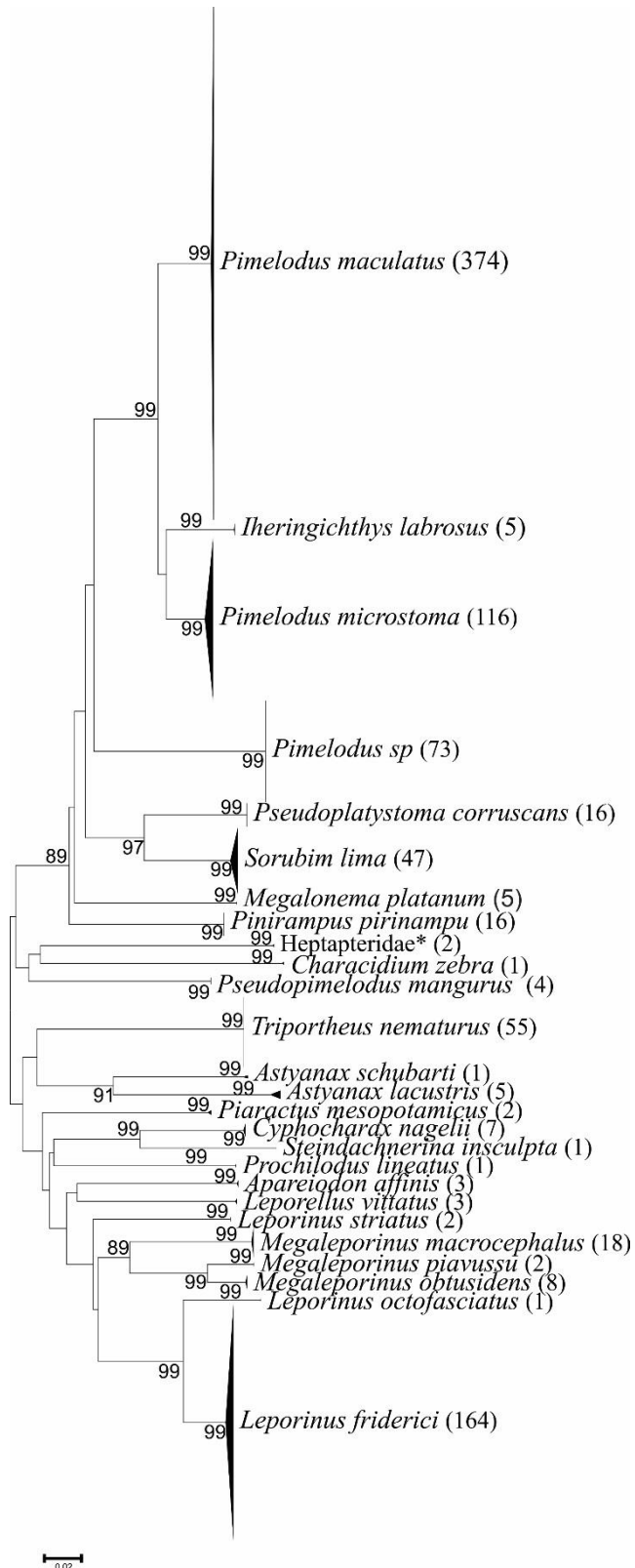
222

223 **Tabela 2.** Resumo da distribuição de frequência relativa das distâncias genéticas K2P intraespecíficas e  
 224 interespecíficas. Conjunto de dados utilizados englobam apenas sequências de espécimes identificados. Não  
 225 foram considerados nos cálculos de comparação os grupos com apenas um representante. Valores (%). E.P: Erro  
 226 padrão.

<b>Comparação</b>	<b>Táxon</b>	<b>Dist. Mínima</b>	<b>Dist. Média</b>	<b>Dist. Máxima.</b>	<b>E.P.</b>
<b>Dentro da espécie</b>	25	0	0,10	0,51	0,06
<b>Dentro do gênero</b>	4	0,76	5,06	7,25	0,6
<b>Dentro de família</b>	4	4,63	6,31	7,85	0,65
<b>Dentro de ordem</b>	2	8,15	10,57	12,98	0,82

227

228 A árvore NJ-K2P comprimida aponta baixa distância entre as amostras identificadas  
 229 ao nível de espécie e os vouchers retirados do BoldSystems (<1%), além de altos índices de  
 230 sustentabilidade dos ramos (Figura 3). A análise de distância para o táxon mais próximo  
 231 (DVP) foi realizada para mensurar a distância entre os táxons relacionados. A menor distância  
 232 DVP foi observada entre *Megaleporinus obtusidens* e *Megaleporinus piavussu* ( $D = 4,59 \pm$   
 233  $0,90$ ) (ver tabela 1)



234

0.02

235 **Figura 3.** Dendrograma representando as distâncias genéticas das espécies encontradas. A distância genética  
 236 Kimura-2-Parâmetros relacionada pelo método de Neighbor-Joining com 1000 pseudoréplicas através do  
 237 software MEGA v6.0. Valores de sustentabilidade dos ramos são apresentados ao lado dos nós em cada  
 238 bifurcação, valores inferiores a 70% foram ocultados. Os nomes dos grupos em itálico indicam a  
 239 correspondência ao menor nível taxonômico possível, abundância absoluta indicada entre parênteses. (\*)  
 240 Espécies para as quais as sequências não estão depositadas no BOLD.

241 **Abundância e composição taxonômica de ovos amostrados**

242 Em relação aos pontos estudados, o baixo rio das Cinzas apresentou o maior número  
243 de espécie (20), enquanto o rio Congonhas apresentou o menor número (1) (Tabela 3).

244 Dentro das 20 espécies encontradas para o baixo rio das Cinzas, *Pimelodus maculatus*  
245 (219), *Pimelodus microstoma* (74), *Leporinus friderici* (44), *Sorubim lima* (32) e  
246 *Megaleporinus macrocephalus* (18) foram as mais abundantes (Tabela 3).

247 Para as 11 espécies encontradas no rio Tibagi, *Pimelodus maculatus* (138), *Leporinus*  
248 *friderici* (98), *Pimelodus sp* (73), *Pimelodus microstoma* (38) e *Pinirampus pirinampu* (16)  
249 foram as mais abundantes. O rio Congonhas, apresentou apenas uma espécie sendo ela  
250 *Triportheus nematurus* (23) (Tabela 3).

251 Quando comparado os dois tributários estudados, a maior diversidade foi encontrada  
252 para o rio das Cinzas com 21 espécies, o que representou 84% das espécies identificadas a  
253 nível específico (Figura 4). Dentre as espécies capturadas, foi observada a presença de  
254 *Pseudopimelodus mangurus*, uma espécie de rara captura, categorizada como vulnerável e a  
255 espécie *Pseudoplatystoma corruscans* categorizada como quase ameaçada.

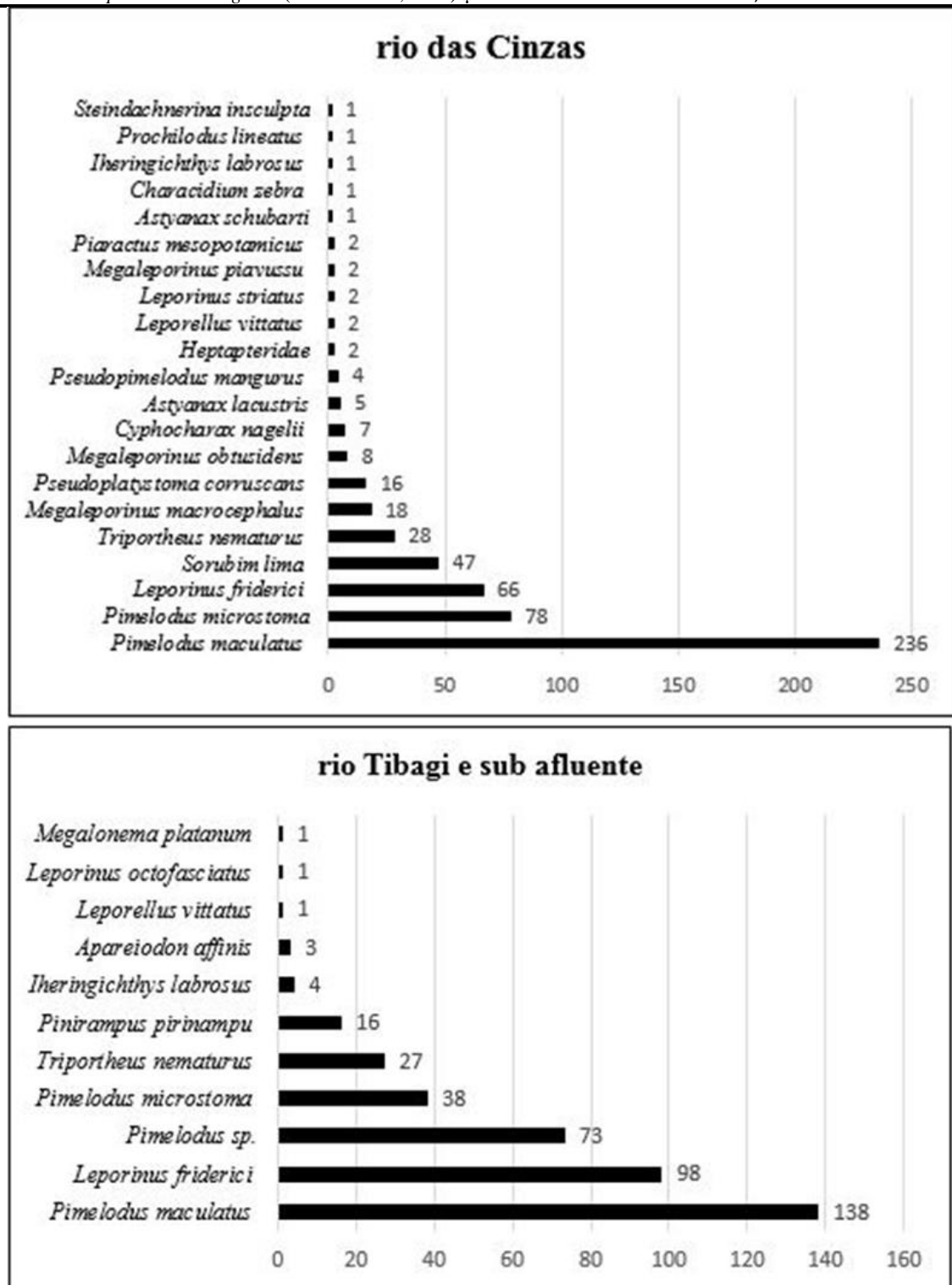
256

257 **Tabela 3.** Tabela de distribuição de espécies nos tributários do reservatório de Capivara (dezembro de 2012 a  
 258 março de 2015). (%) Frequência relativa para cada espécie (N): Frequência absoluta, por ponto de coleta. BC:  
 259 baixo Cinzas; MC: médio Cinzas; CO: rio Congonhas e BT: baixo Tibagi. ‡ Espécie ameaçada de extinção  
 260 (Abilhoa & Duboc, 2004). †Espécie não nativa para o alto rio Paraná (Júlio Jr et al., 2009).

UHE Capivara						
Espécies	%	N	BC	MC	CO	BT
<b>Characiformes</b>						
<b>Anostomidae</b>						
<i>Leporellus vittatus</i> (Valenciennes, 1850)	0,32	3	2			1
<i>Leporinus friderici</i> (Bloch, 1794)	17,7	164	44	22		98
<i>Leporinus octofasciatus</i> Steindachner, 1915	0,1	1				1
<i>Leporinus striatus</i> Kner, 1858	0,22	2	1	1		
<i>Megaleporinus macrocephalus</i> Garavello & Britski, 1988 †	1,94	18	18			
<i>Megaleporinus obtusidens</i> (Valenciennes, 1837)	0,86	8	8			
<i>Megaleporinus piavussu</i> Britski, Birindelli & Garavello, 2012	0,22	2	1	1		
<b>Characidae</b>						
<i>Astyanax lacustris</i> (Lütken, 1875)	0,53	5	5			
<i>Astyanax schubarti</i> Britski, 1964	0,1	1	1			
<b>Crenuchidae</b>						
<i>Characidium zebra</i> Eigenmann, 1909	0,1	1		1		
<b>Curimatidae</b>						
<i>Cyphocharax nagelii</i> (Steindachner, 1881)	0,75	7	7			
<i>Steindachnerina insculpta</i> (Fernández-Yépez, 1948)	0,1	1	1			
<b>Parodontidae</b>						
<i>Apareiodon affinis</i> (Steindachner, 1879)	0,32	3				3
<b>Prochilodontidae</b>						
<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)	0,1	1	1			
<b>Serrasalminidae</b>						
<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887)	0,22	2	1	1		
<b>Triporthidae</b>						
<i>Triporthus nematurus</i> (Kner, 1858) †	5,92	55	13	15	23	4
<b>Siluriformes</b>						
<b>Heptapteridae</b>						
Heptapteridae	0,22	2	1	1		
<b>Pimelodidae</b>						
<i>Iheringichthys labrosus</i> (Lütken, 1874)	0,53	5	1			4
<i>Megalonema platanum</i> (Günther, 1880)	0,1	1				1
<i>Pimelodus maculatus</i> Lacepède, 1803	40,3	374	219	17		138
<i>Pimelodus microstoma</i> Steindachner, 1877	12,5	116	74	4		38
<i>Pimelodus</i> sp.	7,87	73				73
<i>Pinirampus pirinampu</i> (Spix & Agassiz, 1829)	1,7	16				16
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> (Spix & Agassiz, 1829)	1,7	16	16			
<i>Sorubim lima</i> (Bloch & Schneider, 1801) †	5,06	47	32	15		
<b>Pseudopimelodidae</b>						

*Pseudopimelodus mangurus* (Valenciennes, 1835) ‡

0,43 4 4



**Figura 4.** Espécies encontradas para cada um dos tributários: rio das Cinzas e rio Tibagi, os números nas barras indicam a quantidade de espécimes.

261  
262  
263  
264

265 O rio Tibagi e seu subafluente (rio Congonhas) apresentaram uma menor diversidade  
266 de espécies (11), representando 44% do total identificadas. Ovos de *Leporellus vittatus*,

267 *Iheringichthys labrosus*, *Triporthus nematurus*, *Pimelodus microstoma*, *Leporinus friderici* e  
268 *Pimelodus maculatus* foram encontrados tanto no rio Tibagi quanto no rio das Cinzas. Para  
269 ambos tributários, a abundância e riqueza de espécies nativas e migradoras se sobrepuseram  
270 às três espécies não-nativas identificadas *Triporthus nematurus*, *Megaleporinus*  
271 *macrocephalus* e *Sorubim lima*, as duas últimas encontradas apenas no rio das Cinzas. Para as  
272 nativas destaca-se em abundância a espécie migradora de longa distância *Pimelodus*  
273 *maculatus*, que soma 374 do total de ovos identificados (40,3%).

274

## 275 **DISCUSSÃO**

276

### 277 **Resolução do status taxonômico dos ovos de peixes**

278 A análise das sequências resultou na identificação a nível específico de 99,78% das  
279 amostras, eficácia obtida também em outros estudos que utilizaram a mesma metodologia  
280 para identificação de produtos reprodutivos de peixes (Hubert et al. 2008; García-Dávila et al.  
281 2014; Becker et al. 2015; García-Dávila, et al. 2015; Rodrigues et al. 2017). A precisão da  
282 identificação de espécies por meio do DNA *barcode* depende, da presença de sequências de  
283 referência de alta qualidade disponíveis em bancos de dados como GenBank e BOLD (Becker  
284 et al., 2015). Deste modo, a ótima taxa de identificação de ovos a nível de espécie no presente  
285 trabalho é devido ao fato da bacia do alto rio Paraná apresentar um grande conjunto de dados  
286 de código de barras disponível para sua ictiofauna (Pereira et al., 2013).

287 Ainda em relação a eficiência do DNA *barcode*, cabe citar dois principais trabalhos  
288 realizados com ictioplâncton em reservatórios do rio Paranapanema. Frantine-Silva et al.  
289 (2015), pôde identificar 99,81% das amostras analisadas comparando as sequencias de COI  
290 das com as sequencias disponíveis no banco de dados. Do mesmo modo, Lima (2015)  
291 também obteve resultados bastante satisfatórios empregando a técnica DNA *barcode*,  
292 podendo identificar 88,44% das amostras a nível específico, com similaridade média acima de

293 99% para sequencias depositadas no BoldSystems. Ambos trabalhos citados analisaram  
294 ictioplâncton de vários reservatórios ao longo do rio Paranapanema com total de 536 amostras  
295 para Frantine et al. (2015) e 961 para Lima (2015). O presente trabalho amostrou 928 ovos  
296 apenas para os principais tributários do reservatório de Capivara, ampliando  
297 consideravelmente a análise para este local.

298 Dezenove das 25 espécies identificadas nesse estudo, também foram encontradas por  
299 de Frantine-Silva et al. (2015) e Lima (2015) para as mesmas regiões estudadas. Com o  
300 considerável aumento de amostras para o reservatório Capivara, foi possível observar seis  
301 novas espécies que ainda não haviam sido identificadas nesses trabalhos anteriores, *Astyanax*  
302 *schubarti*, *Characidium zebra*, *Leporellus vittatus*, *Leporinus striatus*, *Pseudopimelodus*  
303 *mangurus* e *Steindachnerina insculpta*.

304 Apenas duas amostras apresentaram correspondência inespecífica, com similaridade  
305 média de 91,62%, sendo classificadas apenas no nível de família. Esta baixa similaridade  
306 provavelmente deve estar associada a grande diversidade da região Neotropical, onde é  
307 normal que nem todas as espécies estejam ainda devidamente validadas e depositadas, uma  
308 vez que comporta uma ictiofauna muito rica e diversificada, e apesar de muitas espécies já  
309 descritas, muitas ainda aguardam a descrição (Reis et al. 2003; Lévêque et al. 2008).

310 Com exceção destes dois indivíduos, as demais amostras puderam ser identificadas a  
311 nível específico com alta confiabilidade, incluindo táxons com identificação taxonômica  
312 complexa como no caso do gênero *Astyanax* e da família Anostomidae que podem facilmente  
313 incorrer em erro quanto a identificação mesmo em indivíduos adultos por métodos  
314 taxonômicos tradicionais (Garavello & Britski, 2003; Bertaco & Garutti, 2007). Duas espécies  
315 pertencentes ao gênero *Astyanax*: *Astyanax lacustris* e *Astyanax schubarti* e sete espécies da  
316 família Anostomidae: *Leporellus vittatus*, *Leporinus friderici*, *Leporinus octofasciatus*,  
317 *Leporinus striatus*, *Megaleporinus macrocephalus*, *Megaleporinus obtusidens* e

318 *Megaleporinus piavussu*, foram identificadas com uma correspondência alta para espécimes  
319 depositados no banco de dados (> 99%) (ver tabela 1).

320 Em outros estudos, o DNA *barcode* foi utilizado com sucesso para auxiliar na  
321 identificação de espécies com complexidade morfológica (Toffoli et al. 2008; Hebert;  
322 Ratnasingham, & Waard, 2003). Por exemplo, Toffoli et al (2008) ao utilizarem DNA  
323 barcode para delimitar espécies da família Potamotrygonidae, que possui várias espécies que  
324 são difíceis de delimitar, observaram que a família passou por um processo de especiação  
325 rápida e que três das espécies compartilham amplamente os haplótipos, sugerindo que  
326 DNA barcode, juntamente com caracteres morfológicos, podem auxiliar estudos  
327 taxonômicos.

328 Hebert; Ratnasingham & Waard (2003) ao utilizarem DNA barcode para estudarem  
329 divergências entre espécies estreitamente relacionadas em todo reino animal, observaram que  
330 as divergências das sequências da região COI permitiram a discriminação dessas espécies em  
331 todos os filos, exceto cnidária. Deste modo, os autores expuseram que esse sucesso no  
332 diagnóstico de espécies reflete as altas taxas de mudança de sequência no COI na maioria dos  
333 grupos de animais.

334 O presente estudo teve como diferencial a análise de apenas amostras de ovos. Embora  
335 a identificação das larvas de peixes seja difícil, a tarefa é ainda mais problemática para os  
336 ovos, devido ao seu pequeno tamanho (1 mm) e similaridade entre as espécies (Richards,  
337 2006), fazendo com que a identificação por caracteres morfológicos a nível específico não  
338 inclua este estágio, justamente pela impossibilidade de identificá-los.

339 Diante disto, ao identificar quase 100% das amostras composta por ovos pela técnica  
340 DNA barcode, este estudo se mostra de grande relevância, uma vez que análises de  
341 identificação de ovos de peixes ainda são escassos, principalmente no ambiente de água doce  
342 da região Neotropical (Oliveira et al., 2008; Hermes-Silva et al., 2009; Frantine-Silva et al.,  
343 2015), se concentrando principalmente no ambiente marinho (Shao; Chen & Wu, 2002.;

344 Burghart et al. 2014; Harada et al. 2015; Hubert et al. 2015; Lin et al. 2016; Hoffmann et al.  
345 2017; Rodrigues et al. 2017). Além disso, a identificação correta de ovos de peixes é crucial  
346 para reconhecer e proteger as áreas de reprodução para espécies comercialmente importantes  
347 bem como as ameaçadas de extinção (Valdez-Moreno et al. 2010).

348

### 349 **Abundancia e composição taxonômica**

350 Diversos fatores influenciam os padrões de distribuição e a estrutura da assembleia de  
351 peixes, uma vez que cada espécie seleciona o local de desova baseado em um conjunto de  
352 características bióticas e abióticas, tal como: localização, período, temperatura, duração e  
353 intensidade reprodutiva dos adultos. Assim só se reproduzem em condições adequadas, a fim  
354 de garantir um número suficiente de sobreviventes (Bialetzki et al. 2005; Baumgartner et al.  
355 2008). Contudo, ambientes influenciados por barramentos carecem de condições ideais para  
356 sobrevivência e reprodução de muitas espécies de peixes sul-americanas (Agostinho & Gomes  
357 2005; Agostinho et al. 2008). Em estudos de identificação de produtos reprodutivos de peixes  
358 pela técnica DNA *barcode* realizados em reservatórios do rio Paranapanema, foi observada  
359 uma maior riqueza de espécies para o reservatório Capivara e seus tributários, rio Tibagi e rio  
360 das Cinzas (Frantine–Silva et al. 2015; Lima, 2015).

361 Este trabalho realizou a identificação de 928 ovos provenientes do rio das Cinzas e rio  
362 Tibagi durante três períodos de piracema, e pode contribuir com seis novas espécies ainda não  
363 identificadas em estudos anteriores realizados por Lima (2015) e Frantine-Silva et al. (2015).  
364 Assim, o total de espécies identificadas por DNA *barcode* considerando todas as análises no  
365 rio Paranapanema corresponde a cerca de 49,03 % da riqueza de espécies documentadas para  
366 esta região (155) (Duke Energy, 2008).

367 Quando considerado apenas o reservatório da UHE Capivara foram identificadas 52  
368 espécies nos trabalhos de Lima (2015) e Frantine-Silva et al. (2015), de tal modo que as

369 outras 6 novas espécies identificadas contribuíram para um total de 58 espécies identificadas  
370 para este reservatório por meio da técnica de DNA *barcode*.

371 Neste estudo, foram identificados produtos reprodutivos de 25 espécies, dentre elas 15  
372 nativas com deslocamento reprodutivo, podendo realizar pequenas migrações, tais como:  
373 *Astyanax altiparanae* (Vazzoler 1996), *Leporinus friderici*, *Apareiodon affinis*, *Iheringichthys*  
374 *labrosus*, *Steindachnerina insculpta* (Agostinho et al. 2003), *Leporinus octofasciatus* (Duke  
375 Energy 2008), *Astyanax schubarti* e *Cyphocharax nagelii* (Suzuki et al. 2004). Foram também  
376 identificados os migradores de longa distância: *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus*  
377 *lineatus*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Pinirampus pirinampu* (Agostinho et al. 2003),  
378 *Pimelodus maculatus* e *Leporinus obtusidens* (Suzuki et al. 2004).

379 Segundo Shibatta et al. (2007) a fragmentação dos rios, devido a construção de  
380 barragens, impede que muitas espécies de peixes migratórias e reofílicas completem o  
381 processo reprodutivo. Analisando ovos e larvas de peixes, Baumgartner et al. (2008)  
382 observaram evidências de intensas atividades reprodutivas de peixes migradores em  
383 tributários do rio Paraná. A partir disto, tais autores destacaram que a presença de tributários  
384 livres de barramentos é extremamente importante para a manutenção da diversidade  
385 ictiofaunística regional.

386 Mais da metade das espécies identificadas (60%) no presente estudo possuem hábito  
387 de deslocamento reprodutivo, indicando que os afluentes desse reservatório estão sendo  
388 utilizados como rota migratória por estas espécies sendo, portanto, fundamentais para a  
389 manutenção da ictiofauna da bacia a preservação destas áreas de desova. Das 25 espécies, a  
390 maior abundância foi observada para *Pimelodus maculatus* (representando 40,30% das  
391 capturas), o que pode estar relacionado ao seu melhor ajuste dessa em condições de  
392 reservatório em relação às demais espécies migradoras (Frantine–Silva et al. 2015).

393           Entre as 1.497 amostras processadas em reservatórios do rio Paranapanema por Lima  
394 (2015) e Frantine-Silva et al. (2015), ainda não havia sido observada a presença de  
395 *Pseudopimelodus mangurus*, espécie de rara captura e ameaçada de extinção (Abilhoa &  
396 Duboc 2004), e que pela primeira vez foi identificada a partir da técnica de DNA *barcode*  
397 entre amostras de ictioplâncton. No total foram 4 ovos de *P. mangurus* identificadas todas  
398 oriundas da localidade do baixo rio das Cinzas. Frantine –Silva et al. (2015) encontraram para  
399 o mesmo local, uma outra espécie ameaçada de extinção, *Steindachneridion scriptum*  
400 (Abilhoa & Duboc 2004), e apontaram essa região como ponto crítico para conservação das  
401 espécies.

402           Para o rio das Cinzas, vale destacar também a presença de ovos de peixes de grande  
403 porte, encontrados em baixa frequência no rio Paranapanema e de importância comercial, tal  
404 como o *Piaractus mesopotamicus*, popularmente conhecido como Pacú, e de  
405 *Pseudoplatystoma corruscans* conhecido como Pintado (Kubitza et al. 1998; Britto et al.  
406 2003; Hilsdorf et al. 2006). Este último se encontra no Livro Vermelho de Fauna Ameaçada  
407 do Paraná e na categoria de quase ameaçada (Abilhoa & Duboc 2004). A presença de ovos  
408 destas espécies indica que estas estão utilizando este afluente durante o seu ciclo reprodutivo.  
409 Assim esse trecho apresenta importância primordial para o reservatório de Capivara no que  
410 diz respeito a manutenção destas espécies.

411           O rio das Cinzas apresentou uma maior riqueza em número de espécie quando  
412 comparado ao rio Tibagi, o que também foi observado no trabalho de Frantine-Silva et al.  
413 (2015). Segundo Hoffmann, Orsi & Shibatta (2005), o rio das Cinzas é o ambiente mais  
414 afastado da zona lacustre do reservatório, sendo menos influenciado pelo barramento,  
415 apresentando características mais semelhantes ao ambiente original, apresentando uma maior  
416 diversidade.

417 No entanto, o rio Tibagi é o maior tributário do reservatório e segundo maior trecho de  
418 diversidade, sendo apontado por vários estudos como responsável pela manutenção dessa  
419 diversidade (Shibatta et al. 2002; Hoffmann, Orsi & Shibatta 2005). Este rio apresentou  
420 espécies de curto e longo deslocamento reprodutivo, indicando que ele é uma rota alternativa  
421 para completar seus ciclos reprodutivos. Dentre elas, foram encontrados ovos de *Pinirampus*  
422 *pirinampu*, espécie de grande porte e longo deslocamento reprodutivo que, segundo Dias et al.  
423 (2004) utiliza o reservatório de Capivara como local de crescimento e alimentação, mas  
424 escolhe os ambientes lóticos de seus principais afluentes como área de reprodução. Além  
425 disso, dentre os ovos analisados para o rio Tibagi, foi também observada a presença de  
426 *Megalonema platanum*, uma espécie rara na bacia do rio Paraná e para a qual poucas  
427 informações sobre sua biologia são relatadas.

428 Ovos de espécies não nativas para a bacia foram encontrados em ambos os tributários,  
429 porém em um número relativamente baixo de amostras e espécies. *Triportheus nematurus*  
430 esteve presente em ambos os tributários enquanto *Sorubim lima* e *Megaleporinus*  
431 *macrocephalus* foram encontrados apenas no rio das Cinzas. As três espécies são alóctones e,  
432 segundo Júlio Jr et al. (2009), provenientes da invasão após a construção do reservatório de  
433 Itaipu. Embora *Megaleporinus macrocephalus* e *Triportheus nematurus* tenham se dispersado  
434 devido à eliminação da barreira de Sete Quedas, essa supressão de obstáculos não foi o único  
435 motivo da introdução. *Megaleporinus macrocephalus*, foi intensamente estocada para fins de  
436 repovoamento (Agostinho et al., 2007), com escapes registrados de tanques de aquicultura  
437 durante a cheia dos rios (Orsi & Agostinho, 1999). Do mesmo modo, a espécie *Triportheus*  
438 *nematurus* foi intensamente introduzida com fins de repovoamento em vários reservatórios  
439 localizados na bacia do alto rio Paraná (CESP, 1996).

440 Os resultados do presente estudo, ao apresentar espécies migradoras, reofílicas,  
441 ameaçadas, e também não nativas, indicam a importância da identificação dos produtos

442 reprodutivos de peixes em relação a permanência das espécies em ambientes influenciados  
443 por barramentos. Ambos os tributários analisados no estudo apresentaram uma diversidade  
444 considerável de espécies, entre elas espécies de rara captura, corroborando com diversos  
445 autores sobre a importância da preservação de remanescentes lóticos responsáveis pela  
446 manutenção da diversidade da ictiofauna nos reservatórios da bacia do rio Paranapanema  
447 (Shibatta et al. 2002; Shibatta et al. 2007; Vianna & Nogueira 2008; Hoffmann, Orsi &  
448 Shibatta 2005).

449

### 450 **Considerações finais**

451 A utilização do *DNA barcode* para análise dos produtos reprodutivos das espécies de  
452 peixes dos principais tributários do reservatório de Capivara se mostrou de extrema eficiência,  
453 identificando quase todas as amostras a nível específico, uma vez que 100% dessas amostras  
454 foi composta por ovos, que é um estágio de extrema dificuldade de identificação por  
455 caracteres morfológicos.

456 A partir desta identificação, foi possível examinar a composição de ovos de peixes nos  
457 dois tributários influenciados pelo reservatório de Capivara e constatar a sua importância para  
458 a manutenção da diversidade de espécies na bacia, visto que, espécies migradoras, raras e  
459 ameaçadas de extinção estão utilizando estes tributários como área de desova.

460 Os resultados confirmam as altas taxas de sucesso para a identificação de produtos  
461 reprodutivos utilizando *DNA barcode* anteriormente relatadas, demonstrando a importância  
462 que estudos taxonômicos de ovos de peixes continuem utilizando esta técnica.

463 A comparação com as sequências já depositadas no banco de dados se mostrou eficaz,  
464 contudo, o trabalho de atualização de bibliotecas deve continuar a cobrir todas as espécies.

### 465 **REFERÊNCIAS**

466

- 467 Abilhoa V, Duboc LF & Mikich SB. (2004). Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado  
468 do Paraná. *Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná (IAP)*. 630p.
- 469 Agostinho, A. A., Vazzoler, A. E. A. D. M., & Thomaz, S. M. (1995). The high river Paraná  
470 basin: limnological and ichthyological aspects.
- 471 Agostinho, A. A., Gomes, L. C., Fernandez, D. R., & Suzuki, H. I. (2002). Efficiency of fish  
472 ladders for neotropical ichthyofauna. *River Research and Applications*, **18**(3), 299-306.
- 473 Agostinho AA, Gomes LC, Suzuki HI, Julio HF Jr (2003) Migratory fishes of the Upper  
474 Paraná River Basin Brazil. In: *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and  
475 Conservation Status* (eds. Carolsfeld J, Harvey B, Ross C & Baer A), p. 361. International  
476 Development Research Centre, Ottawa, Ontario.
- 477 Agostinho AA, Pelicice FM, Gomes LC. (2008). Dams and the fish fauna of the Neotropical  
478 region: impacts and management related to diversity and Fisheries. *Brazilian Journal of  
479 Biology*, **68**, 1119-1132
- 480 Agostinho AA, Pelicice FM, Petry AC, *et al.* (2007). Fish diversity in the upper Paraná River  
481 basin: habitats, fisheries, management and conservation. *Aquatic Ecosystem Health &  
482 Management*, **10**, 174-186.
- 483 Agostinho AA & Gomes LC. (2005). O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio  
484 Paraná: avaliação e perspectivas. *Ecologia de reservatórios. Impactos potenciais, ações de  
485 manejo e sistemas em cascata* (MG Nogueira, R. Henry & A. Jorcin, orgs.). Rima Editora, São  
486 Carlos, 23-55.
- 487 Baumgartner G, Nakatani K, Gomes LC, *et al.* (2008). Fish larvae from the upper Paraná  
488 River: do abiotic factors affect larval density? *Neotropical Ichthyology*, **6**, 551-558.
- 489 Becker, R. A., Sales, N. G., Santos, G. M., Santos, G. B., & Carvalho, D. C. (2015). DNA  
490 barcoding and morphological identification of neotropical ichthyoplankton from the Upper  
491 Paraná and São Francisco. *Journal of fish biology*, **87**(1), 159-168.
- 492 Bertaco VA & Garutti V. (2007). New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, central  
493 Brazil (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, **5**, 25-30.
- 494 Bialetzki A, Nakatani K, Sanches PV, *et al.* (2005). Larval fish assemblage in the Baía River  
495 (Mato Grosso do Sul State, Brazil): temporal and spatial patterns. *Environmental Biology of  
496 Fishes*, **73**, 37-47.
- 497 Big – ANEEL. Banco de Informações de Geração. Site:  
498 <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/capacidadebrasil.cfm> - acessado em  
499 09/08/2016 às 10:50h: 2016
- 500 Britto, S. G., Sirol, R. N., Vianna, N. C., Jardim, S. M., Santos, J. D., & Pelisari, E. (2003).  
501 *Peixes do rio Paranapanema*. São Paulo: Duke Energy Internacional Geração  
502 *Paranapanema*

- 503 Burghart, S. E., Van Woudenberg, L., Daniels, C. A., Meyers, S. D., Peebles, E. B., &  
 504 Breitbart, M. (2014). Disparity between planktonic fish egg and larval communities as  
 505 indicated by DNA barcoding. *Marine Ecology Progress Series*, **503**, 195-204.
- 506 CESP. Companhia Energética de São Paulo. (1996). *Aspectos limnológicos, ictiológicos e*  
 507 *pesqueiros de reservatórios da CESP no Período de 1986 a 1994*. São Paulo, CESP, 81p.
- 508 Dias JH, Britto SGC, Vianna NC, *et al.* (2004). Biological and ecological aspects of  
 509 *Pinirampus pirinampu* (Spix, 1829), Siluriformes, Pimelodidae. Capivara reservoir,  
 510 Paranapanema River Southern Brazil. *Acta Limnologica Brasileira*, **16**, 293-304.
- 511 Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, Kawabata ZI, Knowler DJ, Lévêque C & Sullivan  
 512 CA. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges.  
 513 *Biological reviews*, **81**(2), 163-182
- 514 Duke Energy. *Peixes do rio Paranapanema*. (2008). Editora Horizonte Geográfico, São Paulo
- 515 Duke Energy. *Peixes do rio Paranapanema*. (2003). Editora Horizonte Geográfico, São Paulo
- 516 Frankham R, Balou JD, Briscoe DA. (2008). *Fundamentos de Genética da Conservação*.  
 517 Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto.
- 518 Frantine-Silva W, Sofia SH, Orsi ML, *et al.* (2015). DNA barcoding of freshwater  
 519 ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Molecular ecology*  
 520 *resources*, **15**, 1226-1237.
- 521 Garavello JC & Britski HA. (2003). Family anostomidae. *Check list of the freshwater fishes*  
 522 *of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, 71-84.
- 523 García-Dávila CR, Castro-Ruiz D, Sánchez-Ribeiro H, Ismiño-Orbe RA, Rengifo-Trigoso D,  
 524 García-Vásquez AR & Renno JF. (2014). Diversidad de ictioplancton en los ríos Curaray,  
 525 Arabela y Napo (Amazonía peruana). *Folia Amazónica*, **23**(1), 67-78.
- 526 García-Dávila C, Castro-Ruiz D, Renno JF, Chota-Macuyama W, Carvajal-Vallejos FM,  
 527 Sanchez H, & Núñez-Rodríguez J. (2015). Using barcoding of larvae for investigating the  
 528 breeding seasons of Pimelodid catfishes from the Marañon, Napo and Ucayali rivers in the  
 529 Peruvian Amazon. *Journal of applied ichthyology*, **31**, 40-51.
- 530 Gleason LU & Burton RS. (2012). High-throughput molecular identification of fish eggs  
 531 using multiplex suspension bead arrays. *Molecular Ecology Resources*, **12**(1), 57-66.
- 532 Harada, A. E., Lindgren, E. A., Hermsmeier, M. C., Rogowski, P. A., Terrill, E., & Burton, R.  
 533 S. (2015). Monitoring spawning activity in a Southern California marine protected area using  
 534 molecular identification of fish eggs. *PloS one*, **10**(8), e0134647.
- 535 Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, *et al.* (2003). Biological identifications through DNA  
 536 barcodes. *Proceedings of the Real Society B*, **270**, 313-321.

- 537 Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life:  
538 cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of*  
539 *the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **270**(Suppl 1), S96-S99.
- 540 Hermes-Silva, S., Reynalte-Tataje, D., & Zaniboni-Filho, E. (2009). Spatial and temporal  
541 distribution of ichthyoplankton in the upper Uruguay river, Brazil. *Brazilian Archives of*  
542 *Biology and Technology*, **52**(4), 933-944.
- 543 Hilsdorf AWS, Resende EK & Marques DKS. (2006). Genética e conservação de estoques  
544 pesqueiros de águas continentais no Brasil: situação atual e perspectivas. *Embrapa Pantanal-*  
545 *Documentos* (INFOTECA-E).
- 546 Hoffmann AC, Orsi ML, Shibatta OA. (2005). Diversidade de peixes do reservatório da UHE  
547 Escola Engenharia Mackenzie (Capivara), rio Paranapanema, bacia do alto rio Paraná, Brasil,  
548 e a importância dos grandes tributários na sua manutenção. *Iheringia, Série Zoologia*, **95**,  
549 319-325.
- 550 Hofmann, T., Knebelsberger, T., Kloppmann, M., Ulleweit, J., & Raupach, M. J. (2017). Egg  
551 identification of three economical important fish species using DNA barcoding in comparison  
552 to a morphological determination. *Journal of Applied Ichthyology*, **33**(5), 925-932.
- 553 Hubert N, Hanner R, Holm E, *et al.* (2008). Identifying Canadian freshwater fishes through  
554 DNA barcodes. *PLoS one*, **3**, 2490.
- 555 Hubert, N., Espiau, B., Meyer, C., & Planes, S. (2015). Identifying the ichthyoplankton of a  
556 coral reef using DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, **15**(1), 57-67.
- 557 Júlio Jr, Ferreira H, Tós CD, *et al.* (2009). A massive invasion of fish species after  
558 eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology*, **7**, 709-  
559 718.
- 560 Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions  
561 through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, **16**,  
562 111-120.
- 563 Kubitza F, Campos JL & Brum JA. (1998). Surubim: produção intensiva no projeto pacu ltda.  
564 e agropeixe Ltda. *Panorama da aquicultura*, **49**, 25-32.
- 565 Leite, R. G., Cañas, C., Forsberg, B., Barthem, R., & Goulding, M. (2007). Larvas dos  
566 grandes bagres migradores. *Inst. Nac. Pesqui. Amaz.-INPA Assoc. Para Conserv. Cuenca*  
567 *Amaz.-ACCA Gráfica Biblos*.
- 568 Lévêque C, Oberdorff T, Paugy D, Stiassny MLJ & Tedesco PA. (2008). Global diversity of  
569 fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 545-567.
- 570 Lima SC. (2015) *Identificação molecular e variação temporal de ovos e larvas de peixes*  
571 *(Teleostei: Osteichthyes) em zonas de influência de reservatórios no rio Paranapanema.*  
572 *Dissertação (Mestrado em Genética e biologia molecular). UEL, Londrina.*

- 573 Lin, H. Y., Chiu, M. Y., Shih, Y. M., Chen, I. S., Lee, M. A., & Shao, K. T. (2016). Species  
574 composition and assemblages of ichthyoplankton during summer in the East China  
575 Sea. *Continental Shelf Research*, **126**, 64-78.
- 576 Lopes CM, Almeida FS, Orsi ML, Britto SGC, Sirol RN & Sodr e LMK. (2007). Fish passage  
577 ladders from Canoas Complex-Paranapanema River: evaluation of genetic structure  
578 maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, **5**,  
579 131-138.
- 580 Nakatani K, Agostinho AA, Baumgartner G, *et al.* (2001). *Ovos e larvas de peixes de água*  
581 *doce: desenvolvimento e manual de identifica o*. EDUEM, Maringá.
- 582 Nakatani K, Baumgartner G, Cavicchioli M. (1997). Ecologia de ovos e larvas de peixes. In:  
583 *A planície de inunda o do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*.  
584 (eds. Vazzoler, A. E. A. M.; Agostinho, A. A.; Hahn, N. S.), p. 281-306. EDUEM, Maringá,  
585 Paraná.
- 586 Oliveira, E. C. D., & Ferreira, E. J. (2008). Spawning areas, dispersion and microhabitats of  
587 fish larvae in the Anavilhanas Ecological Station, rio Negro, Amazonas State,  
588 Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **6**(4), 559-566.
- 589 Oliveira, E. C., Bialezki, A., & Assakawa, L. F. (2008). Morphological development of  
590 *Hypophthalmus fimbriatus* and *H. marginatus* post-yolk-sac larvae (Siluriformes:  
591 *Pimelodidae*). *Zootaxa*, **1707**(1), 37-48.
- 592 Orsi ML. (2010). *Estratégias reprodutivas de peixes: Estratégias reprodutivas de peixes da*  
593 *região média-baixa do rio Paranapanema, reservatório de Capivara*. Blucher, São Paulo.
- 594 Orsi ML, Agostinho AA. (1999). Introdu o de espécies de peixes por escapes acidentais de  
595 tanques de cultivo em rios da bacia do Rio Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*,  
596 **16**(2): 557-560.
- 597 Pegg GG, Sinclair B, Briskey L *et al.* (2006). MtDNA barcode identification of fish larvae in  
598 the southern Great Barrier Reef. *Australia. Scientia Marina*, **70**, 7-12.
- 599 Pereira LH, Hanner R, Foresti F, *et al.* (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate  
600 megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC genetics*, **14**, 20
- 601 Ratnasingham S, Heber PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System  
602 ([www.bacodingoflife.org](http://www.bacodingoflife.org)). *Molecular Ecology Notes*, **7**, 355–364.
- 603 Richards, W. J. (Ed.). (2005). *Early stages of Atlantic fishes: an identification guide for the*  
604 *western central north Atlantic, Two Volume Set (2)*. CRC Press.
- 605 Reis RE, Kullander SO, Ferrari CJJR. (2003). *Check list of the freshwater fishes of South and*  
606 *Central America*. EDPUCRS: Porto Alegre.
- 607 Rodrigues T, Hilsdorf AWS, Pimenta EG & de Amorim AF. (2017). Ocorrência e  
608 identifica o de larvas de Istiophoridae e ovos de Xiphiidae na costa sudeste brasileira.  
609 *Boletim do Instituto de Pesca*, **43**, 78-86.

- 610 Shao, K. T., Chen, K. C., & Wu, J. H. (2002). Identification of marine fish eggs in Taiwan  
611 using light microscopy, scanning electric microscopy and mtDNA sequencing. *Marine and*  
612 *Freshwater Research*, 53(2), 355-365.
- 613 Shibatta AO, Gealh AM, Bennemann ST. (2007). Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia  
614 do rio Tibagi, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*, 7, 125-134.
- 615 Shibatta OA, Orsi ML, Bennemann ST & Silva-Souza AT. (2002). Diversidade e distribuição  
616 de peixes na bacia do rio Tibagi. *A bacia do rio Tibagi. Londrina: EDUEL*, 403-423.
- 617 Stevaux JC, Souza Filho ED & Jabur IC. (1997). A história quaternária do rio Paraná em seu  
618 alto curso. *A Planície De Inundação Do Alto Rio Paraná. UEM-Nupelia, Maringá-PR*.
- 619 Stoeckle M. (2003). Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *AIBS Bulletin*, 53, 796-797.
- 620 Suzuki HI, Vazzoler AEA de M, Marques EE, *et al.* (2004). Reproductive ecology of the fish  
621 assemblage. In: *The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and*  
622 *conservation.* (eds. Thomaz SM, Agostinho AA, Hahn NS), p. 271-292. Leiden, The  
623 Netherlands, Backhuys Publishers, São Carlos, São Paulos.
- 624 Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics  
625 Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- 626 Toffoli D, Hrbek T, Araújo MLGD, Almeida MPD, Charvet-Almeida P & Farias IP. (2008).  
627 A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus  
628 Potamotrygon (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31(1),  
629 324-336.
- 630 Togawa RC, Brígido MM. (2003). PHPH: Web based tool for simple electropherogram  
631 quality analysis. In: *1 st International Conference on Bioinformatics and Computational*  
632 *Biology-IcoBiCoBi.* *Ribeirão Preto.* Disponível em:  
633 <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>.
- 634 Valdez-Moreno M, Vásquez-Yeomans L, Elías-Gutiérrez M, Ivanova NV & Hebert PD.  
635 (2010). Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the  
636 Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. *Marine and Freshwater*  
637 *Research*, 61(6), 655-671.
- 638 Vazzoler ADM. (1996). *Biologia reprodutiva de peixes teleósteos: Teoria e prática.* Maringá.  
639 *Editada da Universidade Estadual de Maringá (EDUEM).*
- 640 Vianna NC, Nogueira MG. (2008). Ichthyoplankton and limnological factors in the Cinzas  
641 River – an alternative spawning site for fishes in the middle Paranapanema River basin,  
642 Brazil. *Acta Limnologica Brasiliense*, 20, 139-151
- 643 Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding  
644 Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B:*  
645 *Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.

- 646 Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. (2009).The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-  
647 BOL. *Journal of Fish Biology*, **74**, 329-356.
- 648 Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and  
649 pitfalls. *BioEssays*, **29** (2), 188-197.